

**Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Institut für Ernährungswissenschaften

Lehrstuhl Lebensmittelchemie



**ANALYTIK UND VORKOMMEN LEBENSMITTELRECHTLICH RELEVANTER  
MARINER BIOTOXINE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON  
PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)- TOXINEN UND  
TETRODOTOXINEN (TTXs)**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität

von Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Tina Helbig  
geboren am 07. Februar 1983 in Jena

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Bernd Luckas (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Georg Pohnert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
3. Prof. Dr. Allan Cembella (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven)

**Datum der Disputation:**

11. Mai 2010.....

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>I    ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>II    TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>III    ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XI</b>
<b>1    EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2    THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1   Zur Problematik von Harmful Algal Blooms (HABs) .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2   Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)- Toxine.....</b>	<b>2</b>
2.2.1   Vorkommen .....	2
2.2.2   Eigenschaften und chemische Struktur .....	3
2.2.3   Metabolisierung .....	7
2.2.3.1   Epimerisierungen .....	7
2.2.3.2   Reduktive Prozesse .....	7
2.2.3.3   Hydrolysen .....	8
2.2.4   Toxizität .....	9
2.2.5   Gesetzliche Regelungen .....	10
<b>2.3   Tetrodotoxine (TTXs) .....</b>	<b>11</b>
2.3.1   Vorkommen .....	11
2.3.2   Eigenschaften und chemische Struktur .....	13
2.3.3   Toxizität .....	14
2.3.4   Gesetzliche Regelungen .....	15
<b>2.4   Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs mittels des Mausbioassays (MBA) ...</b>	<b>16</b>
<b>2.5   Chromatographische Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs .....</b>	<b>17</b>
2.5.1   Detektion nach chromatographischer Trennung.....	17
2.5.1.1   Fluorimetrische Detektion.....	17
2.5.1.1.1   Fluoreszenz.....	17
2.5.1.1.2   Fluoreszenzdetektor .....	17
2.5.1.1.3   Fluoreszenzdetektion von PSP-Toxinen und Tetrodotoxinen.....	18
2.5.1.2   Massenspektrometrische Detektion.....	19
2.5.1.2.1   Aufbau eines Massenspektrometers und Elektrosprayionisation .....	19
2.5.1.2.2   Massenanalysatoren .....	21
2.5.1.2.3   Messtechniken im Massenspektrometer .....	23

2.5.2	Chromatographische Erfassung von PSP-Toxinen .....	24
2.5.2.1	HPLC-FLD-Methoden.....	24
2.5.2.2	LC-MS- und LC-MS/MS-Methoden.....	26
2.5.3	Chromatographische Erfassung von TTXs.....	29
2.5.3.1	HPLC-FLD-Methoden.....	29
2.5.3.2	LC-MS- und LC-MS/MS-Methoden.....	29
<b>3</b>	<b>ZIELSTELLUNGEN DER ARBEIT .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Akkumulation und Metabolisierung der von <i>Alexandrium minutum</i> und <i>Alexandrium ostenfeldii</i> produzierten PSP-Toxine in der Miesmuschel <i>Mytilus edulis</i>.....</b>	<b>34</b>
4.1.1	Einleitung.....	34
4.1.2	Versuchsdurchführung.....	34
4.1.2.1	Probenmaterial.....	34
4.1.2.2	Kultivierung von <i>A. ostenfeldii</i> und <i>A. minutum</i> .....	35
4.1.2.3	<i>In vivo</i> Fütterungsversuch .....	35
4.1.2.3.1	Versuchsdurchführung.....	35
4.1.2.3.2	Extraktion des Probenmaterials .....	37
4.1.2.4	Bestimmung der Gehalte an PSP-Toxinen mittels HPLC-FLD.....	37
4.1.2.4.1	Das HPLC-System .....	37
4.1.2.4.2	HPLC-Bedingungen.....	37
4.1.2.4.3	Nachsäulenderivatisierung und Detektion.....	38
4.1.3	Ergebnisse.....	38
4.1.3.1	Konzentrationen an PSP-Toxinen und Toxinprofile der Kulturen .....	38
4.1.3.2	Akkumulation von PSP-Toxinen in Miesmuscheln .....	40
4.1.3.3	Metabolismus von PSP-Toxinen in Miesmuscheln .....	42
4.1.3.4	Analyse des Hälterungswassers.....	43
4.1.4	Diskussion der Ergebnisse.....	45
<b>4.2</b>	<b>Bildung unbekannter PSP-Toxine durch das Cyanobakterium <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>.....</b>	<b>48</b>
4.2.1	Einleitung.....	48
4.2.2	PSP-Standardsubstanzen.....	48
4.2.3	Probenmaterial .....	48
4.2.4	Extraktion des Probenmaterials .....	49



4.2.5	Isolation der unbekannten Substanzen .....	49
4.2.5.1	Die HPLC-Systeme .....	49
4.2.5.2	Ermittlung der Retentionszeiten.....	49
4.2.5.3	Durchführung der semipräparativen HPLC .....	50
4.2.6	Experimente zur Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie .....	52
4.2.6.1	Analyse mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie.....	52
4.2.6.2	Analyse mittels Q Trap-Massenspektrometrie .....	54
4.2.6.3	Analysen mittels hochauflösender LC-MS/MS .....	58
4.2.7	Diskussion der Ergebnisse.....	61
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs in Kugelfischen unterschiedlicher Herkunft .....</b>	<b>64</b>
4.3.1	Einleitung .....	64
4.3.2	Standardsubstanzen .....	64
4.3.3	Probenmaterial .....	64
4.3.4	Extraktion des Probenmaterials .....	65
4.3.5	Nachweis von TTXs mittels LC-MS und LC-MS/MS.....	65
4.3.5.1	Das LC-MS- und LC-MS/MS-System .....	65
4.3.5.2	HPLC-Bedingungen .....	65
4.3.5.3	MS- und MS/MS-Bedingungen .....	66
4.3.6	Nachweis von PSP-Toxinen mittels HILIC-FLD.....	67
4.3.6.1	Das HPLC-System .....	67
4.3.6.2	HPLC-Bedingungen .....	67
4.3.6.3	Nachsäulenderivatisierung und Detektion.....	67
4.3.7	Nachweis von PSP-Toxinen mittels LC-MS.....	68
4.3.7.1	Das LC-MS-System.....	68
4.3.7.2	HPLC-Bedingungen .....	68
4.3.7.3	MS-Bedingungen.....	68
4.3.8	Ergebnisse.....	69
4.3.8.1	Ergebnisse der Tetrodotoxinanalytik.....	69
4.3.8.2	Ergebnisse der PSP-Toxinanalytik .....	72
4.3.9	Diskussion der Ergebnisse.....	74
<b>4.4</b>	<b>Entwicklung einer LC-MS/MS basierten Methode zur simultanen Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	Einleitung .....	76
4.4.2	Standardsubstanzen .....	76
4.4.3	Probenmaterial .....	77

4.4.4	Entwicklung einer Methode auf der Basis der LC-MS .....	77
4.4.4.1	Das LC-MS-System.....	77
4.4.4.2	Optimierung der chromatographischen Trennung.....	77
4.4.4.3	Optimierung der MS-Parameter.....	80
4.4.5	Übertragung der LC-MS-Methode auf die Kopplung LC-MS/MS .....	82
4.4.5.1	Das LC-MS/MS-System .....	82
4.4.5.2	Optimierung der chromatographischen Trennung.....	82
4.4.5.3	Optimierung der MS/MS-Parameter .....	83
4.4.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen .....	85
4.4.7	Diskussion der Ergebnisse.....	86
4.4.7.1	Chromatographische Trennung .....	86
4.4.7.2	MS- und MS/MS-Parameter .....	87
4.4.8	Anwendung der LC-MS/MS-Methode.....	87
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNGEN.....</b>	<b>90</b>
5.1	Zusammenfassung.....	90
5.2	Summary .....	94
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>107</b>
7.1	Geräte.....	107
7.2	Standardsubstanzen .....	110
7.3	Verwendetes Probenmaterial.....	111
7.4	Chemikalien .....	112
7.5	Tabellen.....	113
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>126</b>
	<b>ERKLÄRUNGEN.....</b>	<b>128</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>129</b>

# I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Chemische Strukturen der PSP-Toxine.....	4
Abb. 2:	Chemische Strukturen von M1-M4.....	6
Abb. 3:	Epimerisierung von GTX4 zu GTX1 durch 11-Sulfat-Keto-Enol-Tautomerie .....	7
Abb. 4:	<i>In vivo</i> Reduktion der N1-OH Toxine GTX1/GTX4 und Neo zu GTX2/GTX3 und STX (↓) und der Toxine GTX1-GTX4 mit einer Sulfatgruppe am C11- Atom zu Neo und STX (→) .....	8
Abb. 5:	Enzymatische Hydrolyse der Carbamoylgruppe von Carbamoyl- bzw. N-Sulfo- carbamoyltoxinen (a) und saure Hydrolyse von N-Sulfocarbamoyltoxinen (b)...	9
Abb. 6:	Mögliche Wege der Akkumulation von TTXs in marinen Organismen [81] .....	12
Abb. 7:	Chemische Strukturen der TTXs .....	14
Abb. 8:	Oxidation von STX im alkalischen Milieu.....	18
Abb. 9:	Aufbau einer ESI-Ionenquelle .....	20
Abb. 10:	Aufbau eines Single-Quadrupol-Massenspektrometers .....	21
Abb. 11:	Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers .....	22
Abb. 12:	Funktionsprinzip einer ZIC-HILIC-Säule.....	27
Abb. 13:	Mögliche Strukturen von Fragmentationen der TTXs [143] .....	31
Abb. 14:	Schema zum Versuchsaufbau und Probenentnahme .....	36
Abb. 15:	PSP-Toxinprofil (a) und PSP-Toxinkonzentrationen (b) von AOTV-A4 sowie PSP-Toxinprofil (c) und PSP-Toxinkonzentrationen (d) von CCMP-113 während der Intoxikationsphase.....	39
Abb. 16:	Chromatogramme eines PSP-Standardmixes (a) und der Kulturen AOTV- A4 (b) und CCMP-113 (c) .....	39
Abb. 17:	PSP-Toxinkonzentrationen in <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit AOTV-A4 (a) und CCMP-113 (b) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase .....	41
Abb. 18:	Prozentuale Verteilung der PSP-Toxine in <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit AOTV-A4 (a und b) sowie CCMP-113 (c und d) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase .....	43
Abb. 19:	Konzentrationen an PSP-Toxinen in <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit AOTV-A4 im Filtrationswasser (a und c) und im Wasser mit den Sedimenten und Exkre- menten (b und d) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase.....	44
Abb. 20:	Konzentrationen an PSP-Toxinen in <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit CCMP-113 im Filtrationswasser (a und c) und im Wasser mit den Sedimenten und Exkre- menten (b und d) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase.....	45

Abb. 21:	HILIC-FLD-Chromatogramme des essigsauren Extraktes von ITEP-018 vor (a) und nach saurer Hydrolyse (b).....	50
Abb. 22:	Überprüfung der U1- bzw. U2- Fraktionen mittels HILIC-FLD (a und b) und mittels Ionenpaarchromatographie (c und d).....	51
Abb. 23:	Scans reiner Fraktionen von U1 und U2 nach Direktinjektion (a und b; Scanbereich $m/z$ 200-500 amu) und nach chromatographischer Trennung (c und d; Scanbereich $m/z$ 150-500 amu) .....	52
Abb. 24:	Produkt- (PI) und Precursorionenscans (Prec) reiner Fraktionen von U1 .....	53
Abb. 25:	LC-MS/MS-Chromatogramme (MRM-Modus) von U1 (a) und U2 (b).....	54
Abb. 26:	EPI-Scans von U1 extrahiert mit Essigsäure von ITEP-018 (a) sowie von den PSP-Toxinen GTX1/4 (b) und GTX2/3 (c) .....	55
Abb. 27:	EPI-Scans von U1 extrahiert mit Essigsäure von ITEP-018 bei CE 5 eV, CES 0 eV; CE 10 eV, CES 10 eV; CE 20 eV, CES 10 eV und CE 30 eV, CES 10 eV (a) sowie von U2 nach saurer Hydrolyse des Extraktes (b) und GTX4 (c) bei CE 30 eV, CES 10 eV .....	56
Abb. 28:	Fragmentierungsschema von U1 ( $m/z$ 426) mit Entstehung von U2 ( $m/z$ 346) (a) sowie Fragmentierungsschema von GTX1/4 ( $m/z$ 412) (b) .....	57
Abb. 29:	LC-MS/MS-Chromatogramme (MRM-Modus) der essigsauren Extrakte sowie nach saurer Hydrolyse von ITEP-018 (a), Jucaz (b), ITEP-A1 (c) und ITEP-028 (d) .....	58
Abb. 30:	Scan im Bereich $m/z$ 200-2000 amu für einen essigsauren Extrakt mit einem charakteristischem $m/z$ 426 amu für U1 .....	59
Abb. 31:	Bestimmung des Verhältnisses $m/z$ von U1 .....	60
Abb. 32:	Fragmentierungsscans von $m/z$ 426 im Bereich $m/z$ 115-500 amu (a) und 50-500 amu (b) .....	60
Abb. 33:	LC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus (a) und LC-MS/MS-Chromatogramm im MRM-Modus (b) eines TTX-Standards (10 ng).....	69
Abb. 34:	LC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus (a) und LC-MS/MS-Chromatogramm im MRM-Modus (b) eines Extraktes von <i>Lagocephalus wheelerie</i> (Gonaden) aus Malaysia.....	70
Abb. 35:	LC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus (a) und LC-MS/MS-Chromatogramm im MRM-Modus (b) des Extraktes eines Kugelfisches aus Phan Thiet, Vietnam .....	71
Abb. 36:	LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) von Extrakten von <i>Takifugu</i> <i>poecilonotus</i> (Haut) aus der Bucht von Osaka (a) und von einem Kugelfisch (Haut) aus der Küstenregion in der Präfektur Wakayama (b) .....	72

Abb. 37:	HILIC-FLD-Chromatogramme eines PSP-Standardmixes (a), eines Extraktes von <i>Takifugu poecilonotus</i> (Haut) aus der Bucht von Osaka (b) und von einem Kugelfisch (Haut) aus der Küstenregion in der Präfektur Wakayama (c) .....	73
Abb. 38:	LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) eines PSP-Standardmixes (a) und eines Kugelfischextraktes (Haut) aus der Küstenregion in der Präfektur Wakayama (b) .....	74
Abb. 39:	LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) eines PSP-Standardmixes (11,5 ng STX, 12,72 ng dcSTX, 10,2 ng Neo, 43,8 ng GTX1, 46,7ng GTX2, 15,4 ng GTX3, 14,4 ng GTX4, 40,2 ng dcGTX2 und 11,3 ng dcGTX3) unter Verwendung einer Luna-HILIC-Säule bei einem Fluss von 1,0 mL min <sup>-1</sup> .....	78
Abb. 40:	LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) von PSP- und TTXs-Standards (11,5 ng STX, 12,7 ng dcSTX, 10,2 ng Neo, 43,8 ng GTX1, 46,7 ng GTX2, 15,4 ng GTX3, 14,4 ng GTX4, 40,2 ng dcGTX2, 11,3 ng dcGTX3 (a), 9,8 ng B1, 21,1 ng C2, 8,3 ng C2, 10 ng TTX, 0,7 ng AnhydroTTX und 0,7 ng 11-DeoxyTTX (b)) .....	80
Abb. 41:	LC-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von PSP- und TTXs-Standards (21,5 ng STX, 12,0 ng dcSTX, 15,3 ng Neo, 43,8 ng GTX1, 46,7 ng GTX2, 15,4 ng GTX3, 14,4 ng GTX4, 40,2 ng dcGTX2, 11,3 ng dcGTX3, 9,3 ng B1, 40,7 ng C1, 12,5 ng C2, 10 ng TTX, 0,6 ng AnhydroTTX und 0,9 ng 11-DeoxyTTX) .....	83
Abb. 42:	Signalintensitäten (cps) von GTX1 (a) und GTX4 (b) für verschiedene MS/MS-Parameter während der Optimierung .....	85
Abb. 43:	LC-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) eines Kugelfischextraktes (Haut) aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama in Japan .....	88
Abb. 44:	LC-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) eines Extraktes von <i>Lagocephalus wheelerie</i> (Gonaden) aus Malaysia .....	89

## II TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	MRM-Übergänge der PSP-Toxine [138, 141].....	28
Tab. 2:	MRM-Übergänge der TTXs [143, 146] .....	31
Tab. 3:	Konzentrationen der Nährstoffkomponenten des F/2-Mediums [147].....	35
Tab. 4:	Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die HPLC-FLD- Bestimmung von PSP-Toxinen nach Diener et al. (2006) [136].....	38
Tab. 5:	Gesamttoxizitäten in $\mu\text{g STXeq. kg}^{-1}$ der Fütterungskulturen AOTV-A4 und CCMP-113 .....	42
Tab. 6:	MS-Parameter der Analytik mittels Triple-Quadrupol-LC-MS/MS .....	53
Tab. 7:	MS-Parameter der Analytik mittels Q Trap-LC-MS/MS .....	55
Tab. 8:	Gradientenprogramm für die LC-MS- und LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs ..	66
Tab. 9:	Parameter für die LC-MS- bzw. die LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs .....	66
Tab. 10:	Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die HILIC-FD- Bestimmung von PSP-Toxinen .....	67
Tab. 11:	Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die LC-MS- Bestimmung von PSP-Toxinen .....	68
Tab. 12:	MS-Parameter für die Bestimmung von PSP-Toxinen.....	69
Tab. 13:	Ergebnisse der LC-MS- und LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs in <i>Lagocephalus wheelerie</i> aus Malaysia .....	70
Tab. 14:	Ergebnisse der LC-MS- und LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Vietnam.....	71
Tab. 15:	Ergebnisse der LC-MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Japan.....	72
Tab. 16:	Ergebnisse der HILIC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen aus Japan .....	73
Tab. 17:	Optimierte Gradientenelution zur Trennung von PSP-Toxinen mittels einer Luna-HILIC-Säule .....	78
Tab. 18:	Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die LC-MS- Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	79
Tab. 19:	$m/z$ und Retentionszeiten von PSP-Toxinen und TTXs für die LC-MS- Bestimmung.....	80
Tab. 20:	MS-Parameter für die Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	81
Tab. 21:	Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die LC-MS/MS- Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	82

Tab. 22: MRM-Übergänge von PSP-Toxinen und TTXs für die Bestimmung mittels LC-MS/MS .....	84
Tab. 23: MS/MS-Parameter für die Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	84
Tab. 24: LODs (S/N 3:1) und LOQs (S/N 5:1) in ng on column für die LC-MS/MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	86
Tab. 25: Sauerstoffgehalt in den Becken und im Tank während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase .....	113
Tab. 26: Temperatur in den Becken und im Tank während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase .....	113
Tab. 27: PSP-Toxinkonzentrationen in der Kultur AOTV-A4 .....	114
Tab. 28: PSP-Toxinkonzentrationen in der Kultur CCMP-113 .....	114
Tab. 29: Abmessungen und Gewichte von <i>M. edulis</i> während der Intoxikationsphase .....	114
Tab. 30: Abmessungen und Gewichte von <i>M. edulis</i> während der Detoxifikationsphase .....	115
Tab. 31: PSP-Toxinkonzentrationen in <i>M. edulis</i> während der Intoxikation mit AOTV-A4 und der Detoxifikation .....	115
Tab. 32: Prozentuale Verteilung der PSP-Toxine in <i>M. edulis</i> während der Intoxikation mit AOTV-A4 und der Detoxifikation .....	116
Tab. 33: PSP-Toxinkonzentrationen in <i>M. edulis</i> während der Intoxikation mit CCMP-113 und der Detoxifikation .....	116
Tab. 34: Prozentuale Verteilung der PSP-Toxine in <i>M. edulis</i> während der Intoxikation mit CCMP-113 und der Detoxifikation .....	117
Tab. 35: PSP-Toxinkonzentrationen im Filtrationswasser von <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit AOTV-A4 .....	117
Tab. 36: PSP-Toxinkonzentrationen im Exkrement- und Sedimentwasser von <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit AOTV-A4 .....	118
Tab. 37: PSP-Toxinkonzentrationen im Filtrationswasser von <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit CCMP-113 .....	118
Tab. 38: PSP-Toxinkonzentrationen im Exkrement- und Sedimentwasser von <i>M. edulis</i> nach Fütterung mit CCMP-113 .....	119
Tab. 39: Fraktionssammlung zur Gewinnung von U1 aus ITP-018 .....	119
Tab. 40: Fraktionssammlung zur Gewinnung von U2 aus ITP-018 nach saurer Hydrolyse des Extraktes .....	121
Tab. 41: Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia (LC-MS-Bestimmung) .....	122

Tab. 42:	Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia (LC-MS/MS-Bestimmung).....	122
Tab. 43:	Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die LC-MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia und Vietnam.....	122
Tab. 44:	Regressionsgerade und LOD (S/N 3:1) für die LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia und Vietnam.....	123
Tab. 45:	Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Vietnam (LC-MS-Bestimmung) .....	123
Tab. 46:	Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Vietnam (LC-MS/MS-Bestimmung).....	123
Tab. 47:	Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Japan (LC-MS-Bestimmung)	123
Tab. 48:	Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die LC-MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Japan.....	123
Tab. 49:	PSP-Toxinkonzentrationen in Kugelfischen aus Japan (HILIC-FLD-Bestimmung).....	124
Tab. 50:	Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die HILIC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen aus Japan.....	124
Tab. 51:	Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen aus Japan .....	124
Tab. 52:	Regressionsgeraden, LODs (S/N 3:1) und LOQs (S/N 5:1) für die LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	125
Tab. 53:	Regressionsgeraden, LODs (S/N 3:1) und LOQs (S/N 5:1) für die LC-MS/MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs .....	125



### III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AnhydroTTX	Anhydrotetrodotoxin
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
API	Atmospheric pressure ionization
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CAD	Collision associated dissociation gas
CE	Collision energy
CEP	Collision cell entrance potential
CES	Collision energy spread
CUR	Curtain gas
CXP	Collision cell exit potential
dcGTX	Decarbamoylgonyautoxin
dcNeo	Decarbamoylneosaxitoxin
dcSTX	Decarbamoylsaxitoxin
d.h.	das heißt
doGTX	Deoxydecarbamoylgonyautoxin
doNeo	Deoxydecarbamoylneosaxitoxin
doSTX	Deoxydecarbamoylsaxitoxin
DP	Declustering potential
EMC	Enhanced multiple charge scan
EMS	Enhanced Q3 Scan
EP	Entrance potential
EPI	Enhanced production scan
ESI	Elektrosprayionisation
evtl.	eventuell
FAB	Fast atom bombardment
FLD	Fluoreszenzdetektion
FP	Focusing potential
FTMS	Fourier-Transform-Massenspektrometrie
FWHM	Full width at half maximum
GC	Gaschromatographie
GTX	Gonyautoxin

HABs	Harmful algal blooms
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
ID	Innendurchmesser
IS	Ion spray voltage
LC	Liquid chromatography
LD <sub>50</sub>	letale Dosis, bei welcher 50% der Versuchstiere sterben
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LIT	Linear Ion Trap
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MBA	Mouse bioassay
MRM	Multiple Ion Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS3	MS/MS/MS
MU	Mouse Unit
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
NEB	Nebulizer gas
Neo	Neosaxitoxin
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP	Normal phase
PI	Production
Prec	Precursorion
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PSU	Practical salinity unit
PMT	Photomultiplier
Q1	Quadrupol 1; Massenanalysator
Q2	Quadrupol 2; Kollisionszelle
Q3	Quadrupol 3; Massenanalysator
RP	Reversed phase
SD	Standard device
SEV	Sekundärelektronenvervielfältiger
SIM	Select Ion Monitoring
S/N	Signal to noise
sog.	sogenannt
sp.	Spezies

---

spp.	mehrere Spezies
STXeq.	Saxitoxinäquivalente
Tab.	Tabelle
Temp	Temperatur
TIC	Totalionenstrom
TTX	Tetrodotoxin
TTXs	Tetrodotoxinanaloga
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
v/v	Volumenanteile im Eluenten
z.B.	zum Beispiel
ZIC	zwitterionisch

## 1 EINLEITUNG

Meerestiere leisten einen wichtigen Beitrag für die menschliche Ernährung, jedoch besteht bei deren Kontamination mit toxischen Substanzen die Möglichkeit der Gefährdung von Mensch und Umwelt. Der Syntheseort zahlreicher mariner Biotoxine ist das Phytoplankton, welches die Basis der marinen Nahrungskette bildet. Bei massiven Vermehrungen aufgrund optimaler Bedingungen bzgl. Wassertemperatur, Licht und hoher Nährstoffkonzentrationen kann es zur Bildung von Algenteppichen kommen [1]. Durch Filtration des Wassers akkumulieren Schalentiere große Mengen an Toxinen, welche durch Sekundärtransfer auch in den folgenden Stufen der marinen Nahrungsketten angereichert werden [2].

Aufgrund der Problematik der globalen Erwärmung in Verbindung mit einer Ausbreitung des in tropischen und subtropischen Regionen vorkommenden toxischen Phytoplanktons in gemäßigte Breitengrade ist eine intensive Kontrolle von Gewässern und Lebensmitteln des aquatischen Bereiches bezüglich des Vorkommens mariner Biotoxine notwendig.

Eine Gefahr der Intoxikation des Menschen besteht insbesondere beim Verzehr kontaminierter Krusten- und Schalentiere sowie bestimmter Fische. Wichtige Verursacher von Vergiftungen nach Verzehr von Seafood sind marine Neurotoxine, zu denen die von Dinoflagellaten und Cyanobakterien produzierten Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)-Toxine und die vorwiegend im asiatischen Raum verbreiteten durch Bakterien gebildeten Tetrodotoxine (TTXs) zählen.

Eine Gefährdung des Menschen durch diese Toxine muss unbedingt verhindert werden und folglich existieren bzgl. der Kontamination von Lebensmitteln mariner Herkunft mit PSP-Toxinen und TTXs international verbindliche rechtliche Regelungen und Grenzwerte, deren Einhaltung durch Kontrollanalysen überprüft werden muss. Hierbei ermöglichen moderne Analysenmethoden die empfindliche und eindeutige Bestimmung beider Toxingruppen aus unterschiedlichen Matrices.

## 2 THEORETISCHER TEIL

### 2.1 Zur Problematik von Harmful Algal Blooms (HABs)

Grundlage der marinen Nahrungskette ist das Phytoplankton, bei dessen Massenvermehrung zumeist ungefährliche Algenblüten entstehen. Allerdings weisen Algenblüten bestimmter Mikroalgenarten ein Gefahrenpotential durch Bildung mariner Biotoxine auf, weshalb diese auch als Harmful Algal Blooms (HABs) bezeichnet werden. Algenblüten werden bzgl. ihrer Auswirkungen in drei Gruppen eingeteilt. Zur ersten Gruppe zählen Massenvermehrungen nichttoxischer Mikroalgen und eine daraus resultierende Verfärbung des Seewassers. Dabei entstehender Sauerstoffmangel kann Fischsterben verursachen [3]. Eine weitere Gruppe von Algenblüten, die den Betrieb intensiver Aquakulturen betrifft, ist durch die Beschädigung der Kiemen von Fischen und Invertebraten charakterisiert [4]. Die dritte Gruppe betrifft die Toxinproduktion durch verschiedene Phytoplanktonspezies, sodass es in Schalentieren nach Filtration des Seewassers zur Aufnahme und Anreicherung der Toxine kommt, sodass nach deren Verzehr durch den Menschen Vergiftungsfälle auftreten [1, 2]. Dem marinen Phytoplankton werden über 5000 bekannten Arten zugeordnet, von denen lediglich 40 die Fähigkeit der Toxinproduktion aufweisen [5, 6].

### 2.2 Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)- Toxine

#### 2.2.1 Vorkommen

PSP-Toxine werden von marinen Dinoflagellaten der Gattungen *Alexandrium* spp., *Gymnodinium* spp. und *Pyrodinium* spp. sowie von verschiedenen Cyanobakterienspezies wie z.B. *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis* und *Planktothrix* spp. gebildet [7-12].

Dinoflagellaten sind eine Klasse einzelliger, photosynthetischer Mikroalgen, welche vorrangig im Salz-, aber auch im Süßwasser verbreitet sind [13]. Weltweit existieren mehr als 2000 Arten, von denen ca. 30 zu den Toxinproduzenten zählen. Toxische Arten weisen die gleiche Morphologie, Zytologie und Physiologie wie nichttoxische Arten auf [14]. Die größte Anzahl toxischer Dinoflagellaten umfasst die Gattung *Alexandrium* spp.

mit 29 bekannten Arten, von denen viele zur PSP-Toxinproduktion in der Lage sind. Sie kommen weltweit vor und weisen eine identische Morphologie jedoch genetische Unterschiede auf [15].

Die der Gattung *Alexandrium* spp. zugeordnete Art *Alexandrium ostenfeldii* ist vor allem an der Nordwestküste Europas (von Island und Norwegen über Dänemark, Belgien und Spanien) und entlang der südöstlichen Küste von Nova Scotia (Kanada) verbreitet. Neben der Bildung von Spiroliden sind einige Arten auch zur PSP-Toxinproduktion befähigt [16-18]. *Alexandrium minutum*, eine weitere Art der Gattung *Alexandrium* spp., ist weltweit unter anderem entlang der Atlantik-, der Mittelmeer- und der Nordseeküste sowie an der Küste Australiens, Neuseelands, Südostasiens und Indiens verbreitet [19-23]. Bereits im Jahre 1988 wurden durch Hallegraeff et al. die PSP-Toxinproduktion durch *Alexandrium minutum* bewiesen [24], jedoch variiert das Toxinprofil verschiedener Strains stark. Während z.B. neuseeländische Strains vorwiegend Neo und STX und nur in geringen Mengen GTX1-GTX4 produzieren [19], wurden in Strains von der Südküste Irlands hauptsächlich GTX2 und GTX3 [23] und in CCMP-113 von der galizischen Küste Spaniens GTX1- GTX4 mit Dominanz von GTX4 [22, 25] nachgewiesen.

Weitere PSP-toxinproduzierende Arten sind unter anderem *A. fundyense*, *A. tamarense*, *A. catenella* und *A. andersonii* [26-29].

### **2.2.2    *Eigenschaften und chemische Struktur***

Als erstes PSP-Toxin wurde im Jahr 1957 STX aus Venusmuscheln der Art *Saxidomus giganteus* aus Alaska isoliert [30], jedoch erfolgte dessen Strukturaufklärung mittels spektroskopischer Methoden erst 1975 [31, 32]. In den folgenden Jahren wurden weitere PSP-Toxine isoliert, deren Strukturen sich stets von Neo und STX ableiten ließen [33].

Die sehr polaren PSP-Toxine besitzen ein Tetrahydropurin-Grundgerüst, einen hohen Stickstoffanteil von 35 %, zwei Guanidinogruppen und eine hydratisierte Carbonylfunktion am C12-Atom. Sie sind stark hygroskopisch, leicht wasserlöslich, löslich in Methanol und Ethanol und unlöslich in organischen Lösungsmitteln. PSP-Toxine besitzen keine UV-Absorption bei einer Wellenlänge über 220 nm und keine natürliche Fluoreszenz. In leicht saurem Milieu sind sie stabil, während unter alkalischen Bedingungen Oxidationsprozesse ablaufen.

Durch Substitution an  $R_4$  kann eine Einteilung in verschiedene Gruppen, die Carbamoyltoxine (STX, Neo, GTX1-GTX4), Decarbamoyltoxine (dcSTX, dcNeo, dcGTX1-dcGTX4), N-Sulfocarbamoyltoxine (B1, B2, C1-C4) und Deoxydecarbamoyltoxine (doSTX, doNeo, doGTX1-3) erfolgen (Abb. 1).

Neben diesen Gruppen zählen auch die von *Lyngbya wollei* produzierten Acetyldecarbamoyltoxine (LWTX1-LWTX3, LWTX5, LWTX6) und die von *Gymnodinium catenatum* gebildeten 4'-Hydroxybenzoatester-Decarbamoyltoxine (GC1-GC2) zu den PSP-Toxinen [10, 34].

Aufgrund zweier Guanidinogruppen ist das Molekül zweifach positiv geladen. Durch Bindung von C11-Hydroxysulfatgruppen an  $R_2$  oder  $R_3$  bzw. von C21-Sulfatgruppen an  $R_4$  reduziert sich die positive Ladung um eine Einheit, und im Fall eines zusätzlichen Sulfocarbamoylrestes an  $R_4$  beträgt die Nettoladung null. Die Konfiguration der Reste sowie die Ladung des Moleküls beeinflussen die Toxizität und die Stabilität der verschiedenen PSP-Toxine [9, 33].

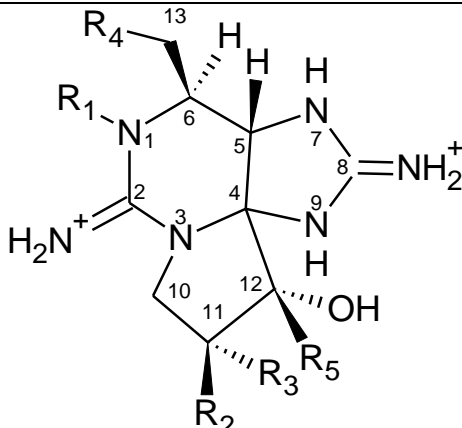
							
Toxin	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	Toxizitätsfaktor	$[M+H]^+$
STX	H	H	H		OH	1,0	300
NEO	OH	H	H		OH	1,0	316
GTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> N-COO- (Carbamoyl-)	OH	1,0	412
GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		OH	0,4	396
GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	0,6	396
GTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	0,7	412
B1	H	H	H		OH	0,1	380
B2	OH	H	H		OH	0,1	396
C3	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	O <sub>3</sub> S-NH-COO- (N-Sulfocarbamoyl-)	OH	-	492
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		OH	0,1	476
C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	0,1	476
C4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	-	492

Abb. 1: Chemische Strukturen der PSP-Toxine

Toxin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Toxizitäts- faktor	[M+H] <sup>+</sup>
dcSTX	H	H	H		OH	1,0	257
dcNEO	OH	H	H		OH	0,4	273
dcGTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HO-	OH	-	369
dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Decarbamoyl-)	OH	0,2	353
dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	0,4	353
dcGTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	-	369
doSTX	H	H	H		OH	-	241
doNeo	OH	H	H		OH	-	257
doGTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H-	OH	-	353
doGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Deoxydecarbamoyl-)	OH	-	337
doGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		OH	-	337
LWTX-1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		H	-	379
LWTX-2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		OH	-	395
LWTX-3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-CH <sub>3</sub> -	OH	-	395
LWTX-5	H	H	H	(Acetyldecarbamoyl-)	OH	-	299
LWTX-6	H	H	H		H	-	283
LWTX-4	H	H	H		H	-	241
GC1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -OH-	OH	-	473
GC2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	(Hydroxybenzoatester- decarbamoyl-)	OH	-	473
GC3	H	H	H		OH	-	377

Fortsetzung Abb. 1

Zu den Carbamoyltoxinen zählen STX, Neo und die Gonyautoxine. Aufgrund des bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegenden Moleküls reagieren alle Carbamoyltoxine basisch, jedoch ist die Basizität der Toxine mit zweifach positiver Nettoladung (Neo und STX) höher als die der Gonyautoxine, die lediglich einfach positiv geladen sind.

Decarbamoyltoxine entstehen aus Carbamoyltoxinen durch Abspaltung der Carbamatgruppe, z.B. durch enzymatische Metabolisierung durch das in Schalentieren vorhandene Enzym Carbamoylase [35, 36]. Sie sind stabil gegenüber chemischen und enzymatischen Einwirkungen.

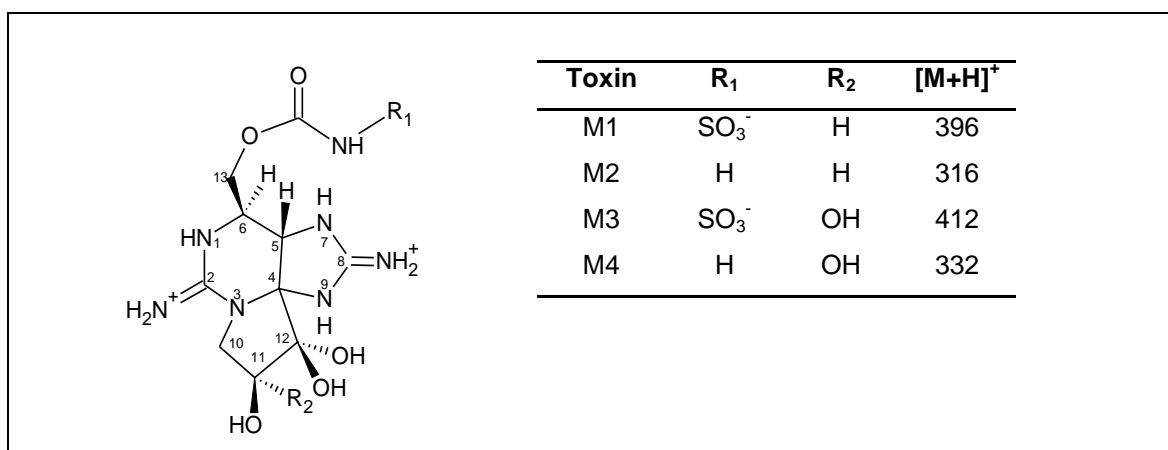
N-Sulfocarbamoyltoxine leiten sich ebenfalls von den Carbamoyltoxinen ab und besitzen eine Sulfatgruppe in der Seitenkette. Aufgrund deprotoniert vorliegender Guanidino-  
gruppen reagieren N-Sulfocarbamoyltoxine kaum noch basisch [9, 33, 37].

Deoxydecarbamoyltoxine weisen im Gegensatz zur Hydroxygruppe der Decarbamoyltoxine am C13-Atom eine Methylkonfiguration auf.



Alle Acetyldecarbamoyletoxine bis auf LWTX-4 besitzen eine Acetatgruppe am C13-Atom, wodurch sie im Vergleich zu den korrespondierenden Carbamoyletoxinen nur eine sehr geringe Toxizität aufweisen. LWTX1, LWTX2 und LWTX3 sind die einzigen PSP-Toxine, welche anstatt einer Hydroxylgruppe an R<sub>5</sub> ein Wasserstoffatom besitzen [10].

Mehrere neue Saxitoxinanaloga (M1-M4) wurden während einer Algenblüte von *Alexandrium tamarens* in Ostkanada im Jahr 2000 in kontaminierten Muschelproben identifiziert, welche nicht in den Algen nachweisbar waren. Die PSP-Toxinanaloga wurden als 11 $\beta$ -Hydroxy-N21-Sulfocarbamoyle saxitoxin (M1), 11 $\beta$ -Hydroxysaxitoxin (M2), 11,11-Dihydroxy-N21-Sulfocarbamoyle saxitoxin (M3) und 11,11-Dihydroxysaxitoxin (M4) charakterisiert [38] (Abb. 2).



**Abb. 2: Chemische Strukturen von M1-M4**

Die Gesamtoxität der PSP-Toxine wird unter Berücksichtigung der Toxizitätsfaktoren im Verhältnis zu STX in STX-Äquivalenten (STXeq.) pro Kilogramm angegeben [39].

### 2.2.3 Metabolisierung

Bedingt durch Metabolisierungsprozesse verändert sich das PSP-Toxinprofil nach Akkumulation in Schalentieren. Im Folgenden werden einige Prozesse vorgestellt.

#### 2.2.3.1 Epimerisierungen

Eine Form der Metabolisierung ist die Epimerisierung durch Keto-Enol-Tautomerisierung, welche eine Umwandlung der 11- $\beta$ -Hdroxysulfatepimere in stabilere 11- $\alpha$ -Hydroxysulfatepimere bewirkt, sodass sich im Verlauf der Zeit ein Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Epimeren von 3:1 einstellt [39]. In Abb. 3 ist die Epimerisierung von GTX4 zu GTX1 dargestellt.

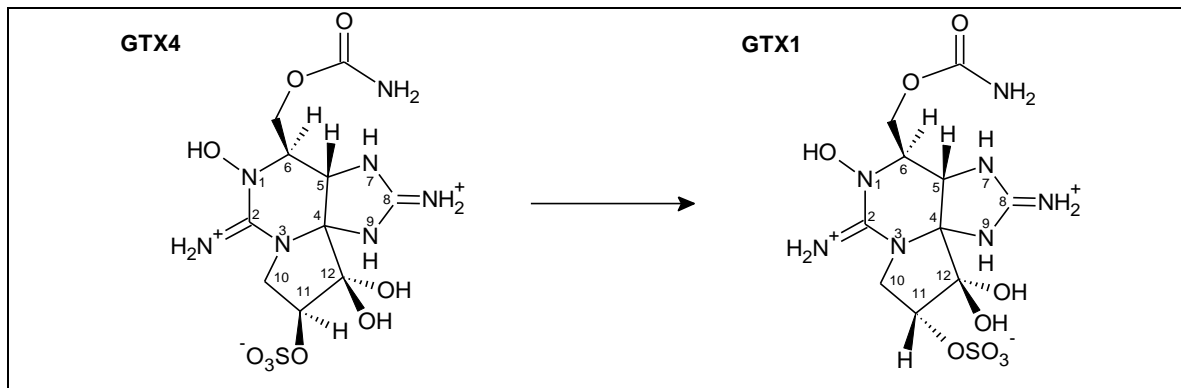
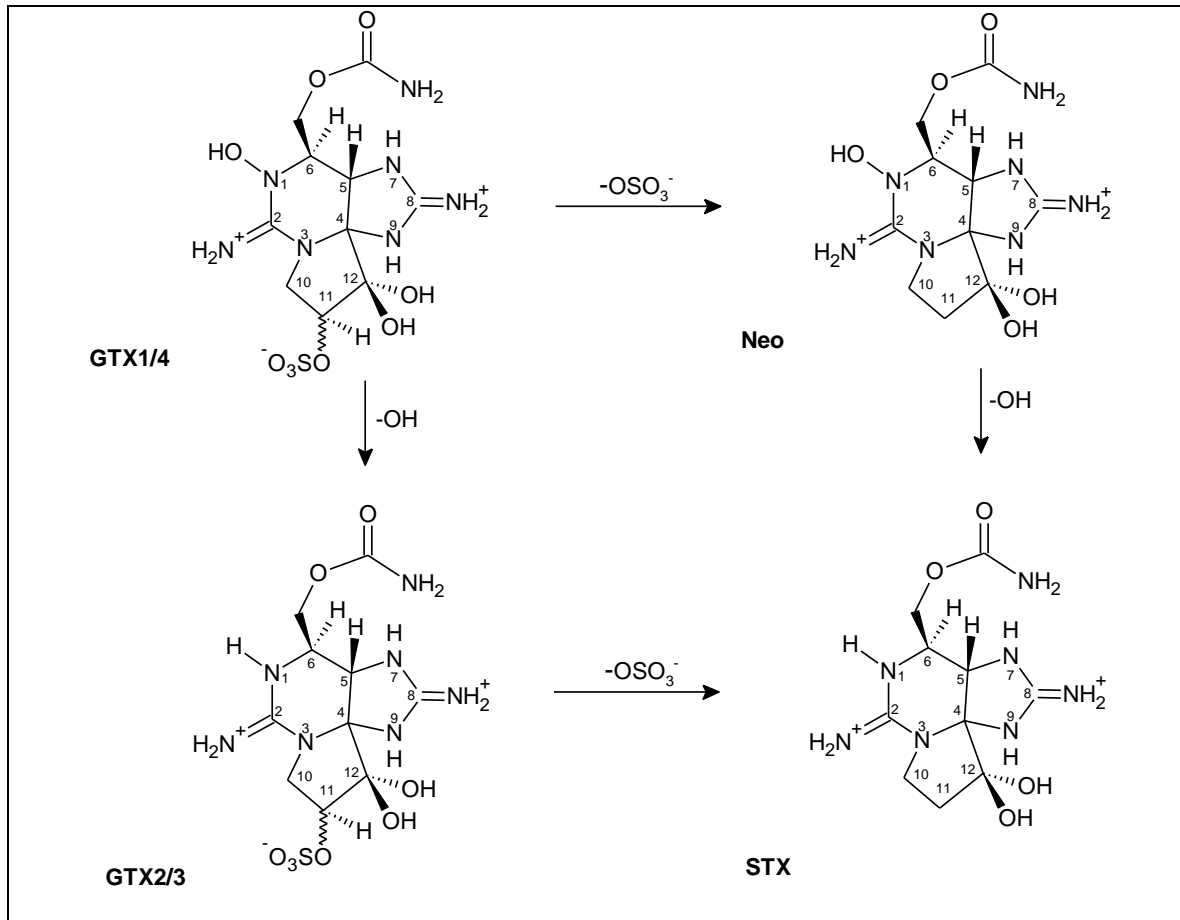


Abb. 3: Epimerisierung von GTX4 zu GTX1 durch 11-Sulfat-Keto-Enol-Tautomerie

#### 2.2.3.2 Reduktive Prozesse

Reduktive Metabolisierungsprozesse werden durch Enzyme und Bakterien sowie durch natürlich vorkommende Reduktantien wie Glutathion und Cystein gesteuert. Sie sind gekennzeichnet durch eine Umwandlung der N1-OH-Gruppe (GTX1, GTX4, Neo), was zur Entstehung einer N1-H-Gruppe (GTX2, GTX3, STX) führt.

Die Reduktion der Sulfatgruppe am C11-Atom stellt ebenfalls einen reduktiven Prozess dar, wobei eine Umwandlung von GTX1/GTX4 zu Neo bzw. GTX2/GTX3 zu STX erfolgt [39-42].

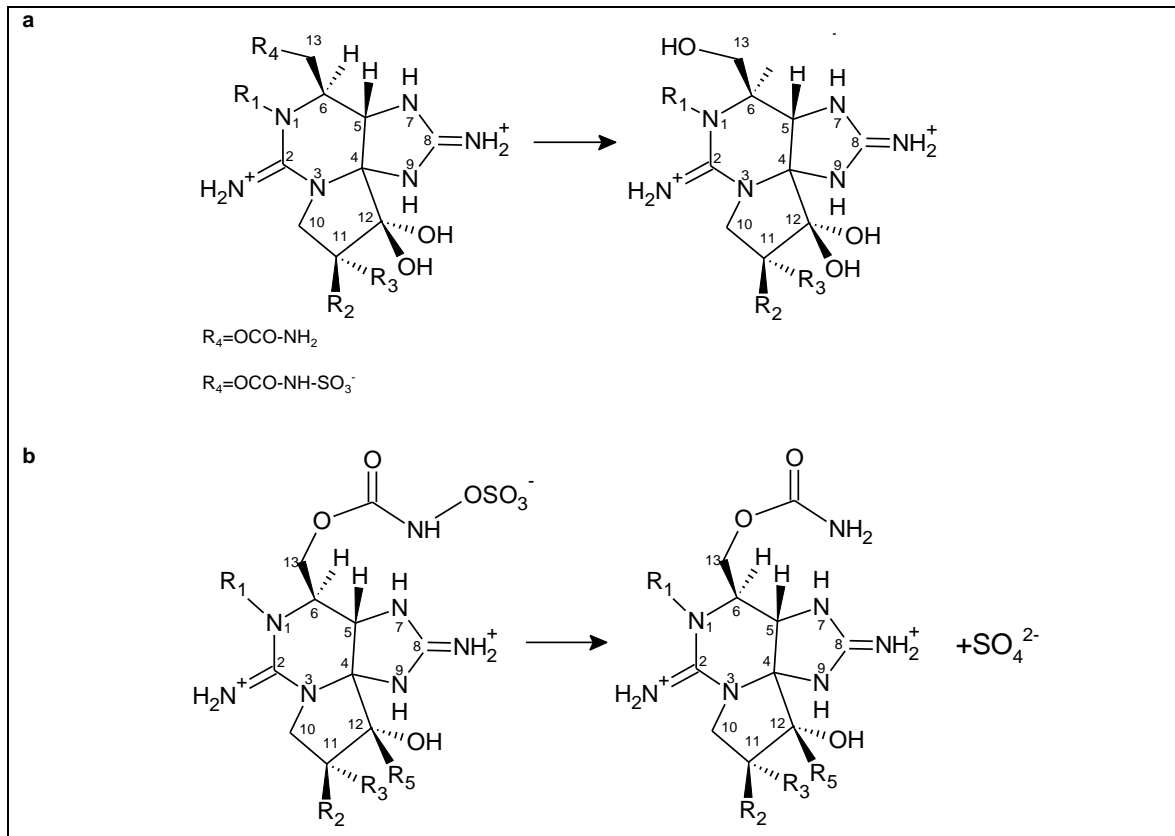


**Abb. 4:** *In vivo* Reduktion der N1-OH Toxine GTX1/GTX4 und Neo zu GTX2/GTX3 und STX (↓) und der Toxine GTX1-GTX4 mit einer Sulfatgruppe am C11-Atom zu Neo und STX (→)

### 2.2.3.3 Hydrolysen

Hydrolytische Metabolisierungen werden in enzymatisch und nichtenzymatisch ablaufende Reaktionen unterteilt, wobei bei den Schalentieren nur wenige Arten zur enzymatischen Umwandlung der N-Sulfocarbamoyltoxine bzw. der Carbamoyltoxine in die entsprechenden Decarbamoyltoxine durch substratspezifische Carbamoylasen in der Lage sind [35, 39, 43].

Durch saure Hydrolyse erfolgt die Transformation der relativ untoxischen N-Sulfocarbamoyltoxine (C3, C1, C2, C4, B1, B2) in die korrespondierenden Carbamoyltoxine (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, STX, Neo), die eine höhere Toxizität aufweisen [39, 44].



**Abb. 5: Enzymatische Hydrolyse der Carbamoylgruppe von Carbamoyl- bzw. N-Sulfocarbamoyltoxinen (a) und saure Hydrolyse von N-Sulfocarbamoyltoxinen (b)**

## 2.2.4 Toxizität

PSP-Toxine sind potente Neurotoxine. In Nerven- und Muskelzellen wird die Reizübertragung durch Aktionspotentiale gesteuert, wobei die Weiterleitung abhängig von dem Verhältnis der Natrium- und Kaliumionen an den erregbaren Membranen ist. Bei Erregung öffnen sich die spezifischen Natriumkanäle, sodass der Einstrom von Natriumionen in die Zelle erfolgt und die Membran depolarisiert wird, was zur Entstehung eines Aktionspotentials führt.

PSP-Toxine binden spezifisch und reversibel an den Rezeptor der Natriumkanäle, blockieren den Einstrom von Natriumionen und hemmen somit die Reizübertragung in Nerven- und Muskelzellen [45, 46]. Die toxische Wirkung der PSP-Toxine wird einerseits durch Interaktionen der protonierten 7,8,9-Guanidinogruppe mit der negativ geladenen Membranoberseite und andererseits durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Membranbestandteilen mit hoher Elektronegativität durch das geminale Diol am C12-Atom bewirkt [33, 47].

Die Toxizität der PSP-Toxine ist abhängig von der Protonierung der Guanidinogruppen, den Substituenten und den Seitenketten. Die höchste Toxizität weisen Carbamoyltoxine auf, gefolgt von den Decarbamoyltoxinen, während N-Sulfocarbamoyltoxine aufgrund negativ geladener Sulfatgruppen, welche von den elektronegativen Gruppen der Membranoberfläche abgestoßen werden, 10 bis 100 mal weniger toxisch sind [48, 49].

Nach einer Vergiftung treten innerhalb der ersten halben Stunde Symptome wie Kribbeln und Taubheitsgefühle auf den Lippen und im Gesicht auf, welche sich anschließend bis in die Extremitäten ausbreiten und zu Lähmungen des gesamten Körpers führen können. Weitere Symptome sind Kreislaufschwächen, Artikulationsprobleme und Gleichgewichtsstörungen. Seltener kommt es zu Schwindelanfällen, Kopfschmerzen, Speichelfluss, Durst, Schwitzen, Erbrechen, Durchfall und Bauchkrämpfen. Bei Aufnahme der letalen Dosis tritt innerhalb weniger Stunden der Tod durch Lähmung der Atemmuskulatur ein. Nach einem Überleben der ersten zwölf Stunden kann eine vollständige Erholung ohne Dauerschäden erfolgen. Es ist bisher kein Gegengift gegen PSP-Toxine bekannt. Als einzig hilfreiche Behandlung hat sich die künstliche Beatmung verbunden mit einer rechtzeitigen Verabreichung von Laxantien erwiesen [9, 50, 51].

### **2.2.5 Gesetzliche Regelungen**

Beim Verzehr von mit PSP-Toxinen kontaminierten Schalentieren besteht für den Verbraucher eine gesundheitliche Gefährdung, sodass es von großer Bedeutung ist, bzgl. einer PSP-Belastung unbedenkliche Nahrungsmittel auf den Markt zu bringen. Auf internationaler Ebene werden Monitoringprogramme zur Überwachung des Vorkommens toxischer Algen vor allen in Gebieten der Schalentierzucht durchgeführt. Bei Überschreitung von festgelegten Algenkonzentrationen (Grenzwerte in Zellen pro Liter) werden Ernteverbote ausgesprochen. Mit dem Einführen dieser Programme nahm die Anzahl von Vergiftungen stark ab [52, 53].

Laut Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs liegt der Grenzwert für PSP-Toxine in Schalentieren und deren Erzeugnissen bei maximal  $800 \mu\text{g STXeq. kg}^{-1}$  Muschelfleisch [54].

In der offiziellen AOAC-Methode von 1990 wird die Extraktion von PSP-Toxinen mit 0,1 M Salzsäure unter Erhitzung auf 100 °C für 5 min beschrieben, wobei der Extrakt sowohl für den Mausbioassay (MBA) als auch für chromatographische Nachweismethoden eingesetzt werden kann [55]. Allerdings werden durch saure Hydrolyse N-Sulfocarbamoyltoxine in die korrespondierenden Carbamoyltoxine umgewandelt, wodurch sich das natürliche Toxinprofil verändert, welches jedoch nach Extraktion der PSP-Toxine mit 0,03 M Essigsäure bestimmt werden kann [56].

## 2.3 Tetrodotoxine (TTXs)

### 2.3.1 Vorkommen

Bis Mosher et al. 1964 im Kalifornischen Molch (*Taricha torosa*) Tetrodotoxin (TTX) nachweisen konnten wurde angenommen, dass TTX und seine Analoga lediglich in Kugelfischen der Familie der *Tetraodontidae* vorkommen [57].

In den folgenden Jahren konnten TTXs jedoch aus einer Vielzahl von Lebewesen isoliert werden, die in keinem engen phylogenetischen Zusammenhang stehen, sodass die endogene Bildung unwahrscheinlich erschien. Seit 1986 wurden Beweise erbracht, dass die Produktion von TTXs durch Bakterien der Gattungen *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. und *Bacillus* spp., aber auch von *Microbacterium* spp. und *Serratia* spp. erfolgt [57-66].

Die durch TTXs hervorgerufene Toxizität der Kugelfische ist folglich durch Anreicherungen von TTXs in der Nahrungskette ausgehend von Bakterien begründet [67]. Dies ließ sich auch in Versuchen mit der nichttoxischen marinen Spezies *Takifugu rubripes* nachweisen, denn nach Fütterung von TTX-reicher Nahrung stiegen in den Geweben dieses Kugelfisches die TTX-Konzentrationen stetig an [68].

Neben Kugelfischen können auch Igelfische (*Diodontidae*) und Spitzkopfkugelfische (*Canthigasteridae*) TTXs enthalten [69].

Weitere TTX-akkumulierende Lebewesen im Süßwasser und im terrestrischen Bereich sind vorrangig Amphibien, z.B. Frösche, Lurche und Molche [67, 70], während bei marinen Organismen TTXs außer in Kugelfischen unter anderem in Tintenfischen, Krabben und Gastropoden nachgewiesen werden konnten [58, 59, 71-73]. Über das Vorkommen von TTXs an der europäischen Küste wurde erstmals im Jahr 2008 berichtet, wobei in Trompetenmuscheln (*Charonia lampas lampas*) von der portugiesischen Südküste TTX und 5,6,11-TrideoxyTTX detektiert werden konnten [74].

Toxische Kugelfische kommen sowohl in marinen tropischen Gewässern, meist in Küstennähe oder an Korallenriffen, als auch in den tropischen Binnengewässern vor, besonders im Gebiet zwischen 47° nördlicher und südlicher Breite.

Die Toxizität von Kugelfischen variiert regional und auch jahreszeitlich, wobei TTXs im gesamten Fischkörper verteilt sind [75]. Bei marinen Kugelfischarten ist die größte Anreicherung vor allem in Leber und Ovarien, gefolgt von Haut und Gastrointestinalsystem, jedoch kaum im Muskelgewebe beobachtbar [67]. Kugelfische aus Küsten- und Brackwasserregionen sowie aus Süßwässern weisen die höchsten Toxinkonzentrationen in der Haut auf [76-80].

In Abb. 6 sind mögliche Wege der Akkumulation von TTXs in marinen Organismen dargestellt.

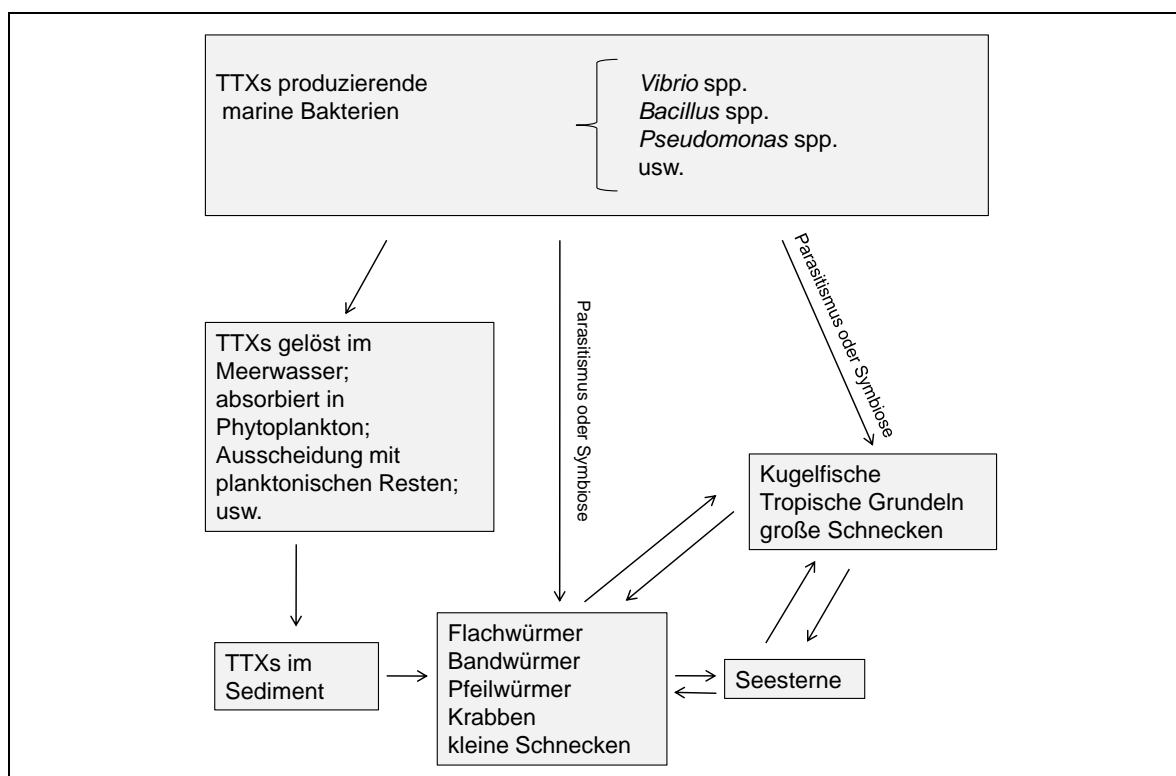


Abb. 6: Mögliche Wege der Akkumulation von TTXs in marinen Organismen [81]

Neben der Akkumulation von TTXs kann die Toxizität vieler Kugelfischarten auch auf dem Vorhandensein von PSP-Toxinen beruhen. Der erste Nachweis von STX in Leber, Ovarien und im Gastrointestinalsystem von Kugelfischen erfolgte 1984 durch Nakamura et al. [82] und wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt, unter anderem durch Analysen mariner Kugelfische aus Japan (*Takifugu pardialis*, *Arothron firmamentum*) [83, 84] und von den Philippinen, wo in *Arothron* spp. STX als Haupttoxin und in geringeren Konzentrationen dcSTX, Neo und B1 nachgewiesen wurden [85]. STX und dcSTX konnten ebenfalls als dominierende Toxine in Süßwasserkugelfischen aus Bangladesch [79], Thailand [80, 86] und Kambodscha, wo STX und dcSTX in der Haut von *Tetraodon turgidus* detektiert wurden [87], identifiziert werden.

Ein gleichzeitiges Vorkommen von TTXs und PSP-Toxinen in Kugelfischen ist ebenfalls möglich, z.B. im marinen Kugelfisch *Takifugu pardialis* aus Japan. 5,6,11-TrideoxyTTX stellte hier das Haupttoxin dar, jedoch waren in fast allen untersuchten Geweben auch PSP-Toxine als Minorkomponenten nachweisbar [88].

### **2.3.2 Eigenschaften und chemische Struktur**

Chemisch betrachtet sind TTXs amphotere Aminochinazolinderivate mit einer mit STX vergleichbaren Polarität. Eine positiv geladene Guanidinogruppe im Molekül bewirkt die Resonanzstabilisierung des Kations. TTXs sind hitzestabil, sowohl in Wasser als auch in Methanol löslich und stabil bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5. Als Extraktionsmittel dient wässrige Essigsäurelösung, wie z.B. 0,03 M Essigsäure. In rein wässriger Lösung liegt TTX teilweise als 4-epi-TTX und Anhydro-TTX vor [89].

Die Struktur von TTX wurde erstmals 1964 beschrieben und das Racemat von Kishi et al. 1972 synthetisiert [90-93]. Die Gruppen der TTXs bestehen aus verschiedenen Analoga [94]. Neben 4-epiTTX und AnhydroTTX, welche chemisch äquivalent zu TTX sind, konnten aus Kugelfischen und Molchen weitere natürlich vorkommende Analoga wie 6-epiTTX, 11-DeoxyTTX, 11-norTTX-6(R)-ol, 11-norTTX-6(S)-ol, 5-DeoxyTTX, 5,6,11-TrideoxyTTX und 4-S-cysteinyITTX isoliert werden [95-100]. In Abb. 7 sind die chemischen Strukturen der TTXs dargestellt.



Toxin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
TTX	H	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	320
4-epiTTX	OH	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	320
6-epiTTX	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	320
11-DeoxyTTX	H	OH	OH	CH <sub>3</sub>	304
11-norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	290
11-norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	290
11-norTTX-6, 6-diol	H	OH	OH	OH	306

Toxin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
AnhydroTTX	OH	CH <sub>2</sub> OH	302
6-epi-anhydroTTX	CH <sub>2</sub> OH	OH	302

Toxin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
5-DeoxyTTX	OH	CH <sub>2</sub> OH	304
5,6,11-TrideoxyTTX	H	CH <sub>3</sub>	272

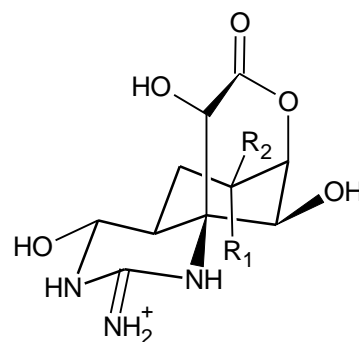
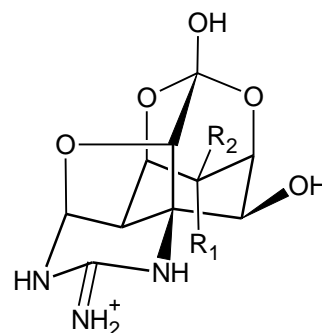
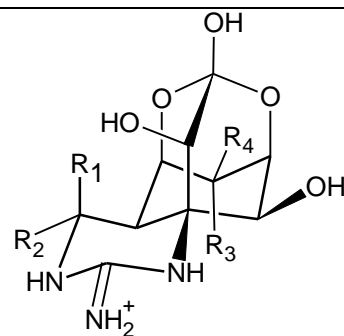


Abb. 7: Chemische Strukturen der TTXs

### 2.3.3 Toxizität

Für den Großteil der Weltbevölkerung stellen Organismen, welche mit TTXs angereichert sein können, keinen wichtigen Bestandteil der täglichen Ernährung dar. Folglich treten Vergiftungsfälle vorrangig nur in Regionen auf, in denen potentiell toxische marine Lebensmittel wie Kugelfische, Gastropoden und Krabben verzehrt werden. Hierzu zählen vor allem südostasiatische Länder unter besonderer Berücksichtigung von Japan, wo Kugelfische als Delikatesse unter der Bezeichnung Fugu in den Verkehr gebracht werden [101]. Weitere Fälle traten unter anderem auch in Malaysia, Hongkong, Singapur, Australien und Bangladesch auf [102-107]. Einzelne Vergiftungsfälle konnten auch in Mexiko und in den USA beobachtet werden [108, 109]. In Japan wird die Zubereitung von

Kugelfischen nur in lizenzierten Restaurants mit speziell ausgebildeten Köchen gestattet. Eine weitaus größere Gefahr stellt jedoch der Verzehr von Kugelfischen außerhalb dieser Restaurants durch privaten Fischfang dar.

Trotz im Vergleich zu den PSP-Toxinen unterschiedlicher chemischer Struktur zählen TTXs ebenfalls zu den Neurotoxinen und rufen eine vergleichbare toxische Wirkung durch die reversible Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle hervor. Grundlage hierfür ist die auch bei TTXs vorhandene und bei physiologischem pH-Wert positiv geladene Guanidinogruppe, welche durch Eindringen in die Öffnung des Natriumkanals eine Konformationsänderung des Kanalproteins hervorruft. Hydroxylgruppen im Molekül dienen zusätzlich durch die Ausbildung von Wechselwirkungen mit der wässrigen Membranoberfläche der Stabilisierung der Bindung an den Kanal [110-112]. Die aufgrund der Reizweiterleitungshemmung in Nerven- und Muskelzellen auftretenden motorischen und sensiblen Lähmungen sind mit den Symptomen einer PSP-Toxinvergiftung vergleichbar. Der Verzehr von Kugelfisch als Delikatesse erfolgt vorwiegend aufgrund des Auftretens leichter Vergiftungssymptome wie Taubheitsgefühle und Kribbeln auf der Zunge.

Die Toxizität von TTX und seinen Epiformen ist gegenüber den fast untoxischen Analoga 5-DeoxyTTX, TrideoxyTTX und 4,9-AnhydroTTX wesentlich höher. Der LD<sub>50</sub>-Wert von TTX beträgt 8-20 µg kg<sup>-1</sup> (orale Aufnahme) bzw. 8 µg kg<sup>-1</sup> (intravenöse Aufnahme) [94].

Kugelfische und Molche sind gegenüber TTXs resistent. Diese Resistenz beruht auf einem Austausch einer normalerweise in der p-Loop-Region der Domäne I des Kanalproteins vorhandenen aromatischen Aminosäure durch eine nichtaromatische Aminosäure, sodass diese veränderten Natriumkanäle eine nur sehr geringe Affinität zu TTX aufweisen [113-115].

#### **2.3.4 Gesetzliche Regelungen**

In der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs wurde festgelegt, dass Fischereierzeugnisse, welche aus giftigen Fischen der Familien der *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diotontidae* und *Canthigasteridae* hergestellt worden sind, nicht in den Verkehr gebracht werden dürfen [54].

## 2.4 Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs mittels des Mausbioassays (MBA)

Der Mausbioassay (MBA), eine offizielle Methode der Association of Analytical Chemists (AOAC), gilt als Referenzmethode für den Nachweis von PSP-Toxinen und TTXs.

Bei der Bestimmung von PSP-Toxinen mittels MBA erfolgt die Extraktion der Proben mit 0,1 M Salzsäure. Nach intraperitonealer Injektion der Extrakte in Mäuse wird auf das Auftreten spezifischer Symptome geachtet und der Todeszeitpunkt registriert. Die Toxizität wird in Mouse Units (MU) angegeben, wobei ein MU der Menge an PSP-Toxinen entspricht, die ausreicht, um eine 20 g schwere Maus nach Injektion von 1 mL Extrakt innerhalb von 15 Minuten zu töten. Die Angabe der Toxizität erfolgt in  $\mu\text{g STXeq. kg}^{-1}$  Muschelfleisch und das Detektionslimit beträgt  $400 \mu\text{g STXeq. kg}^{-1}$  [116]. Ein MU ist äquivalent zu 180 ng STXeq. [117]. Die  $\text{LD}_{50}$ -Werte für den Menschen liegen zwischen 15 und  $50 \mu\text{g STXeq. kg}^{-1}$  Körpergewicht, sodass bereits eine Aufnahme von 1-4 mg tödliche Auswirkungen haben kann.

Bei der Bestimmung von TTX mittels MBA werden Mäusen mit ca. 20 g Gewicht die zu untersuchenden Proben nach Extraktion in 0,1 %iger Essigsäure ebenfalls intraperitoneal injiziert. Ein MU entspricht in diesem Fall der Menge an TTX, die notwendig ist, um eine Maus innerhalb von 30 Minuten zu töten. Ein MU, das Detektionslimit des Testes, ist äquivalent zu 200 ng TTX [118, 119]. Die tödliche Konzentration von TTX für den Menschen liegt zwischen 5000 bis  $6000 \text{ MU kg}^{-1}$  Körpergewicht und die minimale letale Dosis beträgt ca. 10000 MU (2 mg) [101].

Aufgrund der Störanfälligkeit und ethischer Bedenken gegenüber der Anwendung von Tierversuchen sowie fehlender Aussagen über das Toxinprofil wird in vielen Ländern intensiv daran gearbeitet, den MBA durch physikalisch-chemische Nachweismethoden zu ersetzen.

In Bezug auf die Messungen von Toxizitäten, vor allem im Zusammenhang mit Vergiftungen nach dem Verzehr von Kugelfischen, bei denen eine Akkumulation sowohl von PSP-Toxinen als auch von TTXs die Ursache sein kann, ist bei Anwendung des MBA grundsätzlich keine Unterscheidung zwischen den beiden neurotoxisch wirkenden Toxingruppen möglich.

## 2.5 Chromatographische Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs

### 2.5.1 *Detektion nach chromatographischer Trennung*

#### 2.5.1.1 Fluorimetrische Detektion

##### 2.5.1.1.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist eine Art der Lumineszenz, bei der die Energiezufuhr in Form von Licht erfolgt. Erste Fluoreszenzerscheinungen wurden 1565 von Monardes beobachtet.

Heutzutage ist die Fluoreszenzmessung eine der am häufigsten genutzten spektroskopischen Methoden. Fluoreszenzfähige Substanzen sind häufig aromatische iso- und heterozyklische Verbindungen. Durch Energieabsorption in Form von UV-Licht gelangt ein Elektron innerhalb von ca.  $10^{-15}$  s aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand. Fluoreszenz entsteht beim anschließenden Übergang zurück in den Grundzustand mit geringerer Energie, wobei spontan Licht emittiert wird.

Aufgrund der kurzen Zeitspanne kommt es zu keiner Veränderung des Bindungsabstandes. Selten erfolgt die Emission des Lichtes als Resonanzfluoreszenz, wobei Anregungswellenlänge gleich Fluoreszenzwellenlänge ist. In den meisten Fällen geht Energie durch Schwingungen verloren, sodass die Fluoreszenz längerwellig vorliegt [120-122].

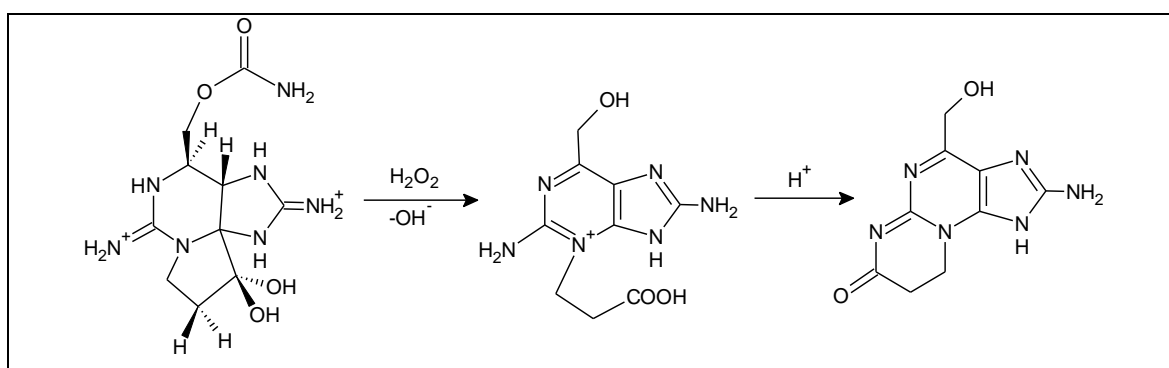
##### 2.5.1.1.2 Fluoreszenzdetektor

Fluoreszenzdetektoren dienen der Quantifizierung fluoreszenzaktiver Substanzen bzw. fluoreszierender Derivate von nicht fluoreszenzaktiven Molekülen. Sie registrieren die von der Säule eluierten Substanzen anhand von Änderungen der Eluentenzusammensetzung. Nach Umwandlung der Fluoreszenzintensitäten in elektrische Signale und deren Erfassung in einer Dateneinheit werden die Substanzen in Form von Peaks dargestellt. Im Fluoreszenzdetektor erfolgt in der Durchflussszelle die Bestrahlung mit UV-Licht einer bestimmten Extinktionswellenlänge. Fluoreszenzaktive Verbindungen absorbieren das eingestrahlte Licht und emittieren Licht mit einer längeren Wellenlänge (Emissionswellenlänge) in alle Richtungen, jedoch erfolgt dessen Messung im Photomultiplier (PMT) senkrecht zum Anregungslicht, um ein rauscharmes Signal zu ermöglichen.

## 2.5.1.1.3 Fluoreszenzdetektion von PSP-Toxinen und Tetrodotoxinen

PSP-Toxine sind nicht fluoreszenzaktive Substanzen, sodass Derivatisierungsreaktionen notwendig sind. Bates und Rapoport beschrieben 1975 eine einfache Methode zur fluorimetrischen Bestimmung, wobei durch Oxidation der Toxine in alkalischer Lösung mit Wasserstoffperoxid fluoreszierende Purinderivate entstehen, deren Fluoreszenz nach Ansäuerung messbar ist. In alkalischer Lösung weisen PSP-Toxine ihre geringste Stabilität auf, sodass ein Bruch der Bindung zwischen dem C12- und dem C4-Atom im Molekül und die sich anschließende Reorientierung zu einem planaren aromatischen System (8-Amino-6-hydroxymethyl-2-iminopurin-3-propionsäure) führt. Eine Ansäuerung verstärkt die Fluoreszenzintensität, da im Säuren die Bildung des korrespondierenden Laktams, einem Pyrimidinopurin, erfolgt (Abb. 8). Während der Oxidation findet ebenfalls eine partielle Elimination der Carbamoyl- bzw. der Sulfocarbamoylseitenkette statt. Die Fluoreszenzmessung wird bei einer Extinktionswellenlänge von 333 nm und einer Emissionswellenlänge von 390 nm durchgeführt [123-125].

Der Ersatz von Wasserstoffperoxid durch Periodsäure führte später zu höheren Fluoreszenzausbeuten [126].



**Abb. 8: Oxidation von STX im alkalischen Milieu**

Die Oxidation kann als Vor- und Nachsäulenderivatisierung eingesetzt werden, wobei die Nachsäulenderivatisierung von Vorteil ist, da bei der Oxidation mit Periodsäure mehrere Oxidationsprodukte und somit mehrere Signale der einzelnen Toxine entstehen und die Oxidation von Neo und B2 zu gleichen Oxidationsprodukten, d.h. zum gleichen Peak führen. Durch eine chromatographische Trennung der einzelnen PSP-Toxine vor der Oxidation (Nachsäulenderivatisierung) können diese Probleme gelöst werden, da hier die Detektion der Oxidationsprodukte summarisch erfolgt [127].

Ein fluorimetrischer Assay zur Bestimmung von TTX basierend auf alkalischer Behandlung und Erhitzung wurde 1976 von Nuñez et al. entwickelt. Die Fluoreszenzaktivität ist durch Bildung eines Chinazolinringes, welcher eine Guanidinogruppe enthält, gegeben. Zwischen  $0,34$  und  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ist ein linearer Zusammenhang zwischen Toxinkonzentration und Fluoreszenzintensität gewährleistet. Die Fluoreszenzintensität wird bei einer Extinktionswellenlänge von  $370 \text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $495 \text{ nm}$  ermittelt [128]. Diese Methode diente als Grundlage bei der Entwicklung von HPLC-Analysen mit Nachsäulenderivatisierung und anschließender Fluoreszenzdetektion.

#### 2.5.1.2 Massenspektrometrische Detektion

##### 2.5.1.2.1 Aufbau eines Massenspektrometers und Elektrosprayionisation

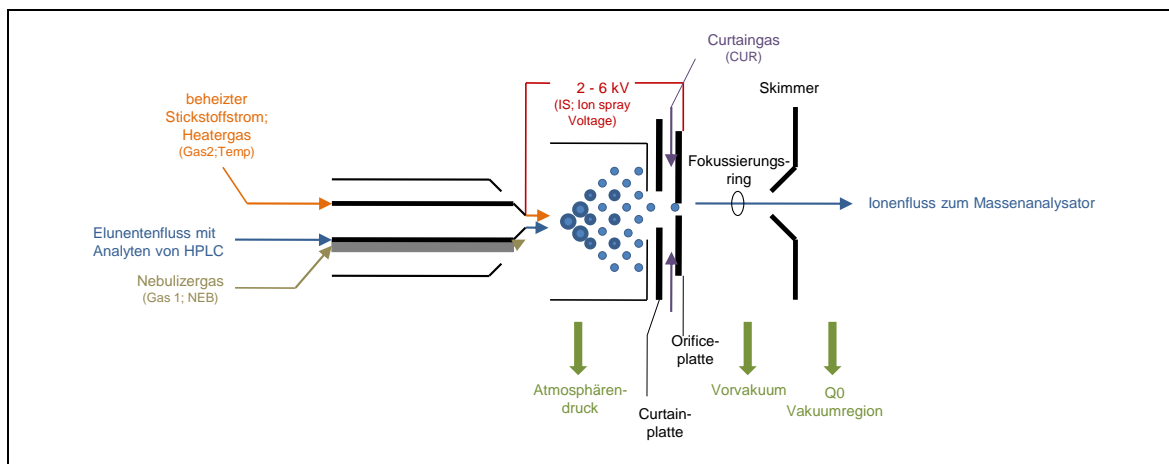
Die Massenspektrometrie (MS) ist ein seit 1960 angewendetes Analysenverfahren. Das Grundprinzip ist die Erzeugung gasförmiger Ionen und deren Trennung anhand ihres Verhältnisses von Masse zur Ladung ( $m/z$ ) mit anschließender Detektion.

Das Massenspektrometer besteht aus einem Interface, in welchem das Eluat in das Massenspektrometer eintritt und wo die Ionisierung abläuft, dem Massenanalysator zur Selektion der erzeugten Ionen und einem Detektor zur Bestimmung der Ionenstrahlintensität. Sekundärelektronenvervielfältiger (SEV) sind oft genutzte Detektoren der Massenspektrometrie.

Die Kopplung von HPLC und MS ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung komplexer Probengemische, wobei Vorteile beider Methoden vereinigt werden. Die Kopplung beider Verfahren wurde in den 1970er Jahren durch die Entwicklung von Ionisierungsverfahren unter Atmosphärendruck anstelle des bisher üblichen Hochvakuums ermöglicht [120, 129].

Eine für die Kopplung mit der LC entwickelte Ionisierungsart ist die Elektrosprayionisation (ESI). Das Eluat aus der LC wird am Ende einer Kapillare, an welche ein elektrisches Feld angelegt ist, als nebelartiges Spray in eine Sprühkammer eingeführt. Durch Erhöhung der Potentialdifferenz zwischen der Austrittsstelle der Flüssigkeitstropfen aus der Kapillare und der gegenüberliegenden Elektrode kommt es zur Bildung eines stabilen Sprays mit einer feinen Vernebelung der Tropfen und der Entstehung positiv ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) oder negativ ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) geladener Molekülionen in Abhängigkeit von der Ionisierungsspannung. Die Bildung mehrfach geladener Ionen und Clusterionen ist ebenfalls möglich.

Die Tröpfchen des Sprays verlieren durch Verdampfen Lösungsmittelmoleküle, sodass sich die Oberflächenspannung bis zum Platzen der Tropfen erhöht (Coulomb-Explosionen) und die Ionen in die Gasphase überführt werden. Durch Zufuhr von Stickstoff in den Elektronenspraynebel erhöht sich die Gesamtionenausbeute [130, 131]. Im Anschluss an die Ionisierung werden die entstandenen Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers weitergeleitet. Abb. 9 stellt den Aufbau einer ESI und Parameter der Ionenquelle dar.



**Abb. 9: Aufbau einer ESI-Ionenquelle**

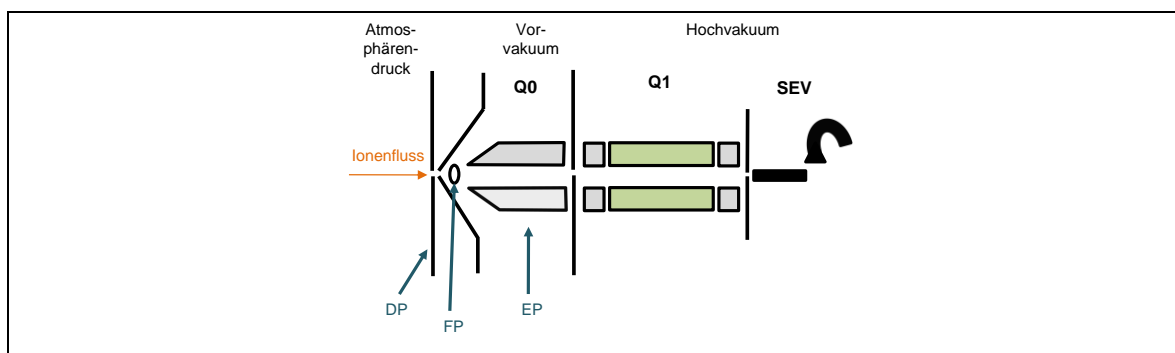
Für eine empfindliche massenspektrometrische Detektion ist die Optimierung der verschiedenen Ionenquellenparameter von großer Bedeutung. Die Spannung des Ionensprays (IS) liegt zwischen der Nadel und der Orificeplatte an, dient der Ionisierung und Vernebelung des Eluentenflusses und beeinflusst die Stabilität des entstehenden Sprays. Das Nebulizergas (NEB) unterstützt die Tröpfchenbildung. Der Strom des Nebulizergases wird vor der Curtainplatte im Winkel von  $90^\circ$  vom Heatergas gekreuzt, welches das Verdampfen der Tröpfchen verbessert. Die Temperatur (Temp) des Heatergases dient ebenfalls der Erhöhung der Verdampfungseffektivität und beeinflusst somit die Nachweisempfindlichkeit, hat aber kaum einen Einfluss auf die Stabilität der Analyten. Bei Anstieg des Analytenflusses sollte die Temperatur ebenfalls zunehmen. Ein weiteres für die Elektrosprayionisation notwendiges Gas ist das Curtaingas (CUR), das den Stickstoffstrom zwischen Orifice- und Curtainplatte darstellt und den Eintritt großer Tropfen und ungeladener Moleküle in die Vakuumregion verhindert, welche ein starkes Hintergrundrauschen und eine Abnahme der Empfindlichkeit bewirken würden.

### 2.5.1.2.2 Massenanalysatoren

Als Massenanalysatoren werden häufig Quadrupole eingesetzt. Sie bestehen aus vier zylinderförmigen, quadratisch angeordneten Stäben. Die gegenüberliegenden Stäbe besitzen die gleiche Polarität der Gleich- und die gleiche Phase der Wechselspannung, während nebeneinander positionierte Stäbe unterschiedliche Polaritäten und eine um  $180^\circ$  versetzte Phase aufweisen. Es werden abwechselnd positive und negative Felder aufgebaut, durch die eine Trennung der Ionen erfolgt. Bei bestimmten Spannungen besitzen nur Ionen mit einem gewissen  $m/z$ -Wert eine stabile Flugbahn durch den Quadrupol. Durch Veränderungen der Spannungen können definierte Massenbereiche analysiert werden.

Bei Quadrupol-Massenspektrometern werden Single- und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer unterschieden. Single-Quadrupol-Massenspektrometer besitzen lediglich einen Quadrupol Q1.

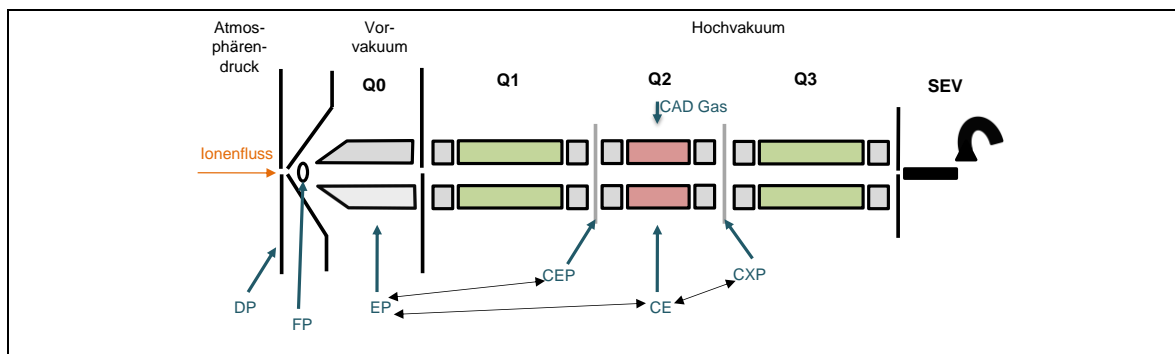
Für eine empfindliche massenspektrometrische Detektion ist neben der Optimierung der Ionenquellenparameter auch die Optimierung verschiedener substanzspezifischer Parameter bedeutsam. Das Declusteringpotential (DP) charakterisiert die zwischen Orificeplatte und Skimmer anliegende Spannung und beeinflusst die Stärke der Fragmentierungen in der Übergangsregion zwischen Ionenquelle und Massenspektrometer. Mit zunehmendem Wert erhöhen sich die Fragmentierungsvorgänge der Ionen. Das Eintrittspotential (EP) kennzeichnet die Differenz der am Skimmer und der im Q0 anliegenden Spannung und das Fokussierungspotential (FP) die am Fokussierungsring vorhandene Spannung. Das FP ist für die Fokussierung der Ionen durch den Skimmer von Bedeutung (Abb. 10).



**Abb. 10: Aufbau eines Single-Quadrupol-Massenspektrometers**



Häufig werden in der Analytik Triple-Quadrupol-Massenspektrometer eingesetzt, welche aus zwei Massenspektrometern (Q1 und Q3) mit einer dazwischen geschalteten Kollisionszelle (Q2) aufgebaut sind (Abb. 11). Neben den bereits im Single-Quadrupol beschriebenen substanzspezifischen MS-Parametern sind zusätzlich noch die Kollisionsenergie (CE), das Eintrittspotential an der Kollisionszelle Q2 (CEP) und das Ausgangspotential an der Kollisionszelle (CXP) von Bedeutung. CEP definiert die Potentialdifferenz zwischen Q0 und Q2, während CXP die Differenz zwischen Q2 und Q3 darstellt. CEP dient der Weiterleitung der Ionen in Q2, in welcher die Fragmentierung durch Kollision mit einem hoch inerten Stickstoffgas erfolgt. Je größer die angewendete Energie CE, umso stärker ist der Fragmentierungsgrad der Ionen. Hierbei spielt auch das kollisionsassoziierte Dissoziationsgas (CAD) eine Rolle, welches den Druck, mit welchem der Stickstoffstrom in die Kollisionszelle geleitet wird, reguliert.



**Abb. 11: Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers**

Neben Triple-Quadrupol-Massenspektrometern werden Ionenfallen-Massenspektrometer eingesetzt, wobei die in der Ionenquelle erzeugten Ionen durch elektromagnetische Felder in einem definierten Bereich gehalten und analysiert werden. Eine mehrfache Wiederholung von Anregung und Massenselektion ist möglich.

Ein hybrides System stellt das Q Trap LC-MS/MS-System dar, welches den gleichen Aufbau wie ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer aufweist, jedoch kann Q3 als Quadrupol oder lineare Ionenfalle (LIT) genutzt werden. Bei Verwendung der LIT werden die Ionen entlang der Mittelachse von Q3 gesammelt. Aufgrund großer Speicherkapazitäten, hoher Scangeschwindigkeiten und hoher Empfindlichkeiten im Vollscanmodus sowie einer großen Massenauflösung ist das Q-Trap-System besonders zur Strukturaufklärung geeignet, während Triple-Quadrupol-Massenspektrometer vorwiegend zur Quantifizierung genutzt werden.

Eine weitere Art der Ionenfallen-Massenspektrometrie stellen Orbitrap-Massenspektrometer mit einer extrem hohen Massengenauigkeit und einer hohen Auflösung dar. Die Massenspektrometrie basiert auf der Messung von Frequenzen. Die Ionen bewegen sich in der Orbitrap im elektrostatischen Feld auf Kreisbahnen um eine spindelförmige Elektrode. Anhand der Frequenz, mit welcher sich die Ionen entlang der Elektrodenachse bewegen, wird mittels Fouriertransformation das  $m/z$ -Verhältnis bestimmt.

#### 2.5.1.2.3 Messtechniken im Massenspektrometer

##### *Single-Quadrupol-Massenspektrometer*

Zur Analyse mittels Single-Quadrupol-Massenspektrometrie sind zwei verschiedene Messtechniken einsetzbar.

Im Q1-Scan erfolgt die Untersuchung eines ausgewählten Massenbereiches. Aufgrund der Darstellung der Molekülionen bzw. deren Fragmentionen eignet sich der Scan-Modus für qualitative Untersuchungen.

Das Select Ion Monitoring (SIM) dient der Selektion einer bzw. mehrerer spezifischer Massen im Q1 und wird für quantitative Analysen verwendet.

##### *Triple-Quadrupol-Massenspektrometer*

Aufgrund des Vorhandenseins einer Kollisionszelle Q2 und eines weiteren Quadrupols Q3 sind mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zusätzlich zu SIM und Scan auch Produktionsanalysen (PI), Precursorionenanalysen (Prec) und Multiple Reaction Monitoring (MRM) nutzbar.

Bei der Produktionsanalyse werden aus dem Q1 nur definierte Precursorionen in die Kollisionskammer Q2 weitergeleitet. Durch Kollision mit den Gasmolekülen entstehen hier Fragmentionen, von denen im Q3 ausgewählte Bereiche gescannt werden.

Bei der Precursorionenanalyse findet im Q1 eine Untersuchung des gesamten Massenspektrums und die Weiterleitung aller Ionen in den Q2 statt, während anschließend im Q3 Fragmentionen mit festgesetzten  $m/z$ -Werten detektiert werden. Dadurch kann das Precursorion eines entstandenen Fragmentes ermittelt werden.

Im MRM-Modus erfolgt in den Quadrupolen Q1 und Q3 ein SIM, das bedeutet, dass von ausgewählten, in Q1 erzeugten Precursorionen nach Fragmentierung in Q2 die entsprechenden Produktionsionen in Q3 detektiert werden können. Der MRM-Modus wird vorwiegend für Quantifizierungen eingesetzt.

### *Q Trap-Massenspektrometer*

Die Verwendung eines Q Trap LC-MS/MS-Systems erlaubt den Einsatz weiterer Messtechniken, unter anderem eines Enhanced Produktionenscans (EPI), Enhanced Q3 Scans (EMS), Enhanced Multiple Charge Scans (EMC) und MS3 (MS/MS/MS).

Beim EPI erfolgt die Selektion der Precursorionen im Q1, deren Fragmentierung im Q2, das Einfangen entstandener Produktionen im Q3 und ein anschließender Massenscan.

Zur Analyse mittels EMS werden die Ionen direkt von der Ionenquelle in den Q3 weitergeleitet und gesammelt. Durch einen Scan im Q3 wird ein Single-MS-Spektrum erstellt.

Im Unterschied zum EMS werden im EMC vor Durchführung des Scans Ionen mit niedriger Ladung, vorwiegend einfach geladene Ionen, aus dem Q3 entfernt. Im MS3-Modus erfolgt im Q2 die Erzeugung von Produktionen aus spezifischen im Q1 selektierten Precursorionen, welche in Q3 gesammelt und bzgl. ihres  $m/z$  detektiert werden. Durch Anlegung einer zusätzlichen Spannung in Q3 werden die detektierten Produktionen angeregt, welche durch Kollisionen mit dem restlichen Stickstoff erneut fragmentieren und sekundäre Produktionen bilden, sodass ein MS/MS/MS-Produkt-Ionenspektrum dargestellt wird.

## **2.5.2 Chromatographische Erfassung von PSP-Toxinen**

### **2.5.2.1 HPLC-FLD-Methoden**

Die offizielle chromatographische Nachweismethode für PSP-Toxine ist die Methode 2005.06 der AOAC nach Lawrence et al. [132]. Sie beruht auf einer Vorsäulenderivatisierung der PSP-Toxine mit Wasserstoffperoxid und Periodsäure gefolgt von einer HPLC-Trennung und einer Fluoreszenzdetektion. Bei der Oxidation mit Periodsäure können im Gegensatz zur Verwendung von Wasserstoffperoxid auch N1-hydroxylierte Toxine wie Neo, B2, GTX1 und C3 in fluoreszierende Produkte umgewandelt werden. Nach anschließender chromatographischer Trennung entstehen für jedes Toxin mehrere Peaks mit unterschiedlichen Intensitäten. Auch ist die Trennung teilweise mit Koelutionen (GTX1/4, GTX2/3, C1/2 und C3/4) verbunden, sodass sich chromatographische Verfahren mit einer Vorsäulenderivatisierung zur Bestimmung der PSP-Gesamttoxizität nicht eignen, zumal diese Methoden sehr zeitaufwendig und die entstehenden Produkte instabil sind. Für die Durchführung von Routineanalysen sind HPLC-Methoden mit einer Nachsäulenderivatisierung wesentlich besser geeignet. Wegweisend für die chromato-

graphische Trennung von PSP-Toxinen war die Entwicklung von Trennverfahren basierend auf der Ionenpaarchromatographie. Hierbei bilden die geladenen Probenmoleküle mit entgegengesetzt geladenen Ionenpaarbildnern im Eluenten Ionenpaare, welche sich wie ungeladene Moleküle verhalten und an einer Reversed-Phase-Säule (RP) getrennt werden können. Alkylsulfonsäuren dienen oft als Ionenpaarbildner für die Separation von Kationen wie den PSP-Toxinen, während zur Trennung von Anionen oftmals Tetrabutylammoniumsalze eingesetzt werden.

1984 setzten Sullivan und Wekell erstmals die Ionenpaarchromatographie in Kombination mit einer Nachsäulenderivatisierung mittels Periodsäure zur Bestimmung von PSP-Toxinen ein. Die mobile Phase bestand aus Hexan- und Heptansulfonsäure als Ionenpaarbildner in wässrigem Ammoniumphosphatpuffer und enthielt zusätzlich Acetonitril als organischen Modifier, um die Trennung stärker basischer Toxine wie Neo, dcSTX und STX zu ermöglichen. Die Separation erfolgte an einer Styren-Divinylbenzen-Copolymersäule (PRP-1). Ein Nachteil dieser Methode lag in der Koelution der unterschiedlich toxischen Substanzen STX und dcSTX, sodass eine exakte Berechnung der PSP-Gesamttoxizität nicht möglich war [133].

Thielert et al. verbesserten die Methode von Sullivan und Wekell durch Verwendung von Oktansulfonsäure als Ionenpaarbildner und einer RP-C18-Säule. Neben Oktansulfonsäure enthielten beide Eluenten für die isokratische Elution in zwei Stufen einen unterschiedlich starken Phosphatpuffer sowie Tetrahydrofuran, während einem Eluenten zusätzlich Acetonitril zugesetzt wurde. Diese Methode ermöglichte die Trennung der Carbamoyl-, Decarbamoyl- sowie der N-Sulfocarbamoyltoxine, lediglich bei GTX1 und GTX4 trat eine Koelution auf [134].

Bei einer von Oshima im Jahre 1995 entwickelten Methode sind drei chromatographische Läufe zur Trennung der PSP-Toxine mit jeweils unterschiedlichen Ionenpaarbildnern notwendig, wodurch diese Methode sehr zeit- und kostenintensiv ist [135].

2006 wurde von Diener et al. eine HPLC-Methode zur Ionenpaarchromatographischen Trennung der underivatisierten PSP-Toxine mit Heptan- und Oktansulfonsäure als Ionenpaarreagenzien mit anschließender Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion entwickelt. Durch Anwendung einer zweistufigen isokratischen Elution wurde die Trennung aller relevanten PSP-Toxine in einem chromatographischen Lauf bei niedrigen Nachweisgrenzen ermöglicht [136].

#### 2.5.2.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Methoden

Die Anwendung der Elektrosprayionisation (ESI) vor massenspektrometrischer Detektion ist für den Nachweis der polaren, basischen PSP-Toxine aufgrund der Bildung stabiler einfach protonierter Molekülionen bei positiver Ionisierung prinzipiell gut geeignet, da die direkte Detektion underivatisierter PSP-Toxine möglich ist [137]. Aufgrund einer sehr polaren Struktur können PSP-Toxine jedoch nicht auf einer RP-Säule getrennt werden, ohne z.B. der mobilen Phase Ionenpaarbildner zuzusetzen. Allerdings ist die Verwendung von Alkylsulfonsäuren als Ionenpaarbildner beim Einsatz massenspektrometrischer Methoden aufgrund der geringen Flüchtigkeit nicht möglich. Auch können die negativ geladenen C-Toxine nicht zusammen mit den anderen PSP-Toxinen in einem chromatographischen Lauf getrennt werden. Zusätzlich führt das Vorhandensein von Ionenpaarbildnern im Eluenten zur Ionensuppression und somit zur Erniedrigung der Empfindlichkeit [138].

Jaime et al. entwickelten eine HPLC-Methode zur direkten Kopplung an ein Massenspektrometer unter Verwendung von Ionenaustauschern in einem wässrigen System, jedoch führte der Einsatz hoher Konzentrationen von Ammoniumacetat in der mobilen Phase zu einem hohen Rauschen und zu einer durch Ionensuppression verursachten geringen Empfindlichkeit [139].

Eine Alternative zum Einsatz von RP-Säulen besteht im Einsatz der hydrophilen Interaktionschromatographie (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC). Es werden analog zur Normalphasenchromatographie polare stationäre Phasen verwendet, jedoch enthält die mobile Phase wässrige Puffersysteme mit einem hohen organischen Anteil wie bei der RP-Chromatographie. Wasser ist das stärkste Elutionsmittel. Die Trennung erfolgt durch hydrophile Interaktion der polaren Toxine mit einer auf der stationären Phase vorhandenen wässrigen Pufferschicht. Der hohe organische Anteil in der mobilen Phase führt zu einer Verstärkung des Ionisierungsprozesses während der ESI.

Dell' Aversano et al. stellten 2005 eine LC-MS/MS Methode unter Einsatz eines niedrig konzentrierten Ammoniumacetatpuffers in der mobilen Phase vor, bei der die Trennung der PSP-Toxine auf einer HILIC-Säule (TSK-Gel Amid-80-Säule) erfolgte. Es konnten hohe Empfindlichkeiten erzielt werden, jedoch kam es durch Matrixeinfluss zu Schwankungen der Retentionszeiten und zur Koelution von GTX1 und GTX2 [138]. Aus

diesem Grund ist diese Methode in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Detektion, nicht jedoch unter Verwendung eines Fluoreszenzdetektors einsetzbar.

Dieses Problem wurde von Diener et al. durch Verwendung einer zwitterionischen (ZIC-) HILIC-Säule gelöst. Es wurde eine Methode entwickelt, welche die vollständige Trennung aller relevanten PSP-Toxine in einem chromatographischen Lauf mit einer anschließenden selektiven und sensitiven massenspektrometrischen als auch fluoreszenzspektrometrischen Detektion ermöglicht. Die mobile Phase mit einem hohen organischen Anteil enthält eine geringe Konzentration an flüchtigem Ammoniumformiat als Puffer. Sowohl zur massenspektrometrischen als auch zur Fluoreszenzdetektion nach vorhergehender Nachsäulenderivatisierung wird eine Gradientenelution zur vollständigen Trennung der PSP-Toxine genutzt [140].

Die ZIC-HILIC-Säule besteht aus Kieselgel mit kovalent gebundenen zwitterionischen Sulfobetaingruppen als stationärer Phase. Elektrostatische Interaktionen und hydrophile Wechselwirkungen zwischen den PSP-Toxinen, der stationären Phase mit der wässrigen Schicht sowie der mobilen Phase bewirken die Trennung der Toxine (Abb. 12).

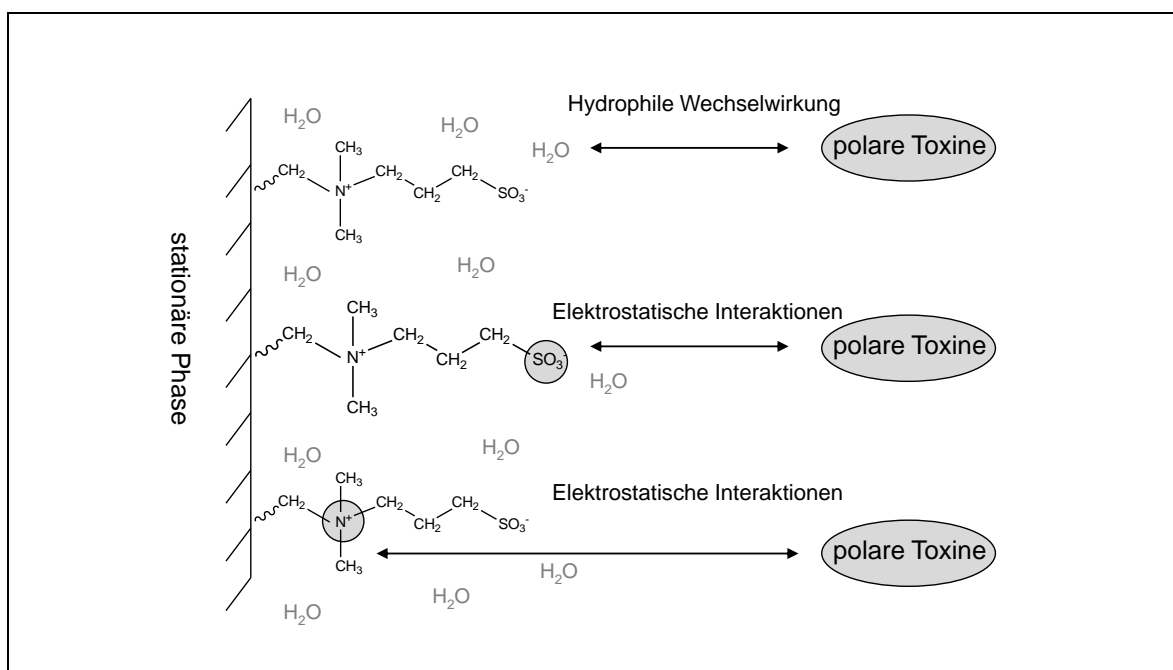


Abb. 12: Funktionsprinzip einer ZIC-HILIC-Säule

Bei Anwendung der ESI bilden die meisten PSP-Toxine einfach geladene Molekülionen ( $[M+H]^+$ ). Aus STX, Neo und dcSTX entstehen zusätzlich durch Wasserabspaltung die Fragmention  $[M+H-H_2O]^+$ , während aus den GTXs und dcGTXs durch Abspaltung einer Sulfatgruppe das Fragmention  $[M+H-SO_3]^+$  mit einem Massenverlust von 80 amu gebildet wird. Aus GTX3, GTX4, dcGTX3 und dcGTX4 entstehen vorrangig  $[M+H]^+$ -Ionen, während die höheren Intensitäten von GTX1, GTX2, dcGTX1 und dcGTX2 durch deren entsprechenden  $[M+H-SO_3]^+$ -Ionen charakterisiert werden. Während der Ionisierung von C1 und C2 bilden sich neben  $[M+H]^+$ - und  $[M+H-SO_3]^+$ -Ionen auch  $[M+NH_4]^+$ -Ionen.

Ausgangslagen für die Fragmentierungen stellen vorwiegend  $[M+H]^+$ -Ionen und im Fall der C-Toxine auch  $[M+NH_4]^+$ -Ionen dar. Während der Fragmentierungen entstehen charakteristische Fragmentionen durch Abspaltung von Wasser, Ammoniak und Teilen der Seitenketten (Tab. 1).

**Tab. 1: MRM-Übergänge der PSP-Toxine [138, 141]**

MRM-Übergang	Toxine					
$m/z > m/z$	nicht sulfatierte PSP-Toxine					
	STX	Neo	dcSTX	dcNeo		
$[M+H]^+ > [M+H-H_2O]^+$	300 > 282	316 > 298	257 > 239	273 > 255		
$[M+H]^+ > [M+H-2H_2O-NHCO]^+$	300 > 204					
$[M+H]^+ > [M+H-2H_2O-NHCO-NH_3]^+$		316 > 220				
$[M+H-H_2O-NH_3-CO_2-HNCONH-H_2C_2NH]^+$	300 > 138					
$[M+H-H_2O-NH_3-CO_2-HNCONH-H_2C_2NOH]^+$		316 > 138				
			257 > 126	273 > 126		
$m/z > m/z$	einfach sulfatierte PSP-Toxine					
	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	B1	B2
$[M+H]^+ > [M+H-SO_3]^+$	412 > 332	396 > 316	396 > 316	412 > 332	380 > 300	396 > 316
$[M+H]^+ > [M+H-SO_3-H_2O]^+$	412 > 314	396 > 298	396 > 298	412 > 314	380 > 282	396 > 298
$[M+H-SO_3]^+ > [M+H-SO_3-H_2O]^+$		316 > 298	316 > 298		300 > 282	316 > 298
$[M+H]^+ > [M+H-2H_2O-NHCO-NH_3]^+$					380 > 204	
$m/z > m/z$	einfach sulfatierte PSP-Toxine					
	dcGTX1	dcGTX2	dcGTX3	dcGTX4		
$[M+H]^+ > [M+H-SO_3]^+$	369 > 289	353 > 273	353 > 273	369 > 289		
$[M+H]^+ > [M+H-SO_3-H_2O]^+$	369 > 271	353 > 255	353 > 255	369 > 271		
$[M+H-SO_3]^+ > [M+H-SO_3-H_2O]^+$		273 > 255	273 > 255			
$m/z > m/z$	zweifach sulfatierte PSP-Toxine					
	C1	C2	C3	C4		
$[M+NH_4]^+ > [M+NH_4-NH_3-2SO_3]^+$	493 > 316	493 > 316	509 > 332	509 > 332		
$[M+NH_4]^+ > [M+NH_4-NH_3-2SO_3-H_2O]^+$	493 > 298	493 > 298	509 > 314	509 > 314		
$[M+H-SO_3]^+ > [M+H-2SO_3]^+$	396 > 316	396 > 316	412 > 332	412 > 332		
$[M+H-SO_3]^+ > [M+H-2SO_3-H_2O]^+$	396 > 298	396 > 298	412 > 314	412 > 314		
$[M+H-2SO_3]^+ > [M+H-2SO_3-H_2O]^+$	316 > 298	316 > 298				

### 2.5.3 *Chromatographische Erfassung von TTXs*

#### 2.5.3.1 HPLC-FLD-Methoden

Yasumoto und Michishita entwickelten 1985 erstmals eine HPLC-Methode zum Nachweis von TTXs mittels Ionenpaarchromatographie auf einer RP-Säule unter Verwendung von Ammoniumheptafluorobutyrat als Ionenpaarbildner. Vor der Fluoreszenzdetektion bei einer Extinktionswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm wird eine Nachsäulenderivatisierung im stark alkalischen Milieu mit 4 N NaOH bei gleichzeitiger Erhitzung durchgeführt, um TTXs in fluoreszenzaktive Substanzen umzuwandeln [142]. 2001 verbesserten Shoji et al. einige Parameter dieser Methode [143].

Eine vergleichbare Methode von Nagashima et al. nutzt ebenfalls die RP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung von TTXs. Hierbei dient jedoch Heptansulfonsäure als Ionenpaarbildner [144]. Der Nachteil des Einsatzes von HPLC-FLD-Methoden liegt in den großen Unterschieden der Fluoreszenzintensitäten einiger TTX-Analoga in Abhängigkeit von deren Struktur, wodurch eindeutige Quantifizierungen schwierig sind. Vor allem 5-DeoxyTTX und 11-DeoxyTTX weisen im Vergleich zu TTX nur 5 bzw. weniger als 1 % der Fluoreszenzintensität auf, während bei 6-epiTTX und 11-norTTX-6(R)-ol nach der Derivatisierung eine 10 bis 20 mal höhere Intensität im Vergleich zu TTX resultiert [143]. Auch ist ein Nachweis von 5,6,11-TrideoxyTTX mittels HPLC-FLD nicht möglich [99].

#### 2.5.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Methoden

Eine Alternative zu den HPLC-FLD-Methoden stellt die massenspektrometrische Analyse dar. Die ESI ist wie zur Ionisation von PSP-Toxinen auch für TTXs geeignet. Obwohl TTXs amphotere ionische Substanzen sind, weisen sie in schwach saurer Lösung basische Eigenschaften auf und können bei positiver Ionisation mit höherer Empfindlichkeit als bei negativer Ionisation detektiert werden [89]. Ebenso wie PSP-Toxine werden TTXs auf einer RP-Säule nicht vollständig getrennt, sodass der mobilen Phase Ionenpaarbildner zugesetzt werden müssen, wodurch aber eine empfindliche massenspektrometrische Detektion erschwert wird.

Shoji et al. stellten 2001 eine LC-MS- und LC-MS/MS-Methode basierend auf der Ionenpaarchromatographie vor. In Anlehnung an die HPLC-FLD-Methode von Yasumoto und Michishita wurde der mobilen Phase Ammoniumheptafluorobutyrat als Ionenpaar-



bildner zugesetzt und für die chromatographische Trennung eine RP-Säule genutzt. Allerdings konnte trotz des Einsatzes niedriger Konzentrationen von Ammoniumheptafluorobutyrat keine vollständige Trennung der TTXs erreicht werden. Auch ergab die Verwendung von Ammoniumheptafluorobutyrat bleibende Rückstände im Massenspektrometer und einen damit verbundenen Anstieg des Grundrauschens [142, 143].

Horie et al. führten Untersuchungen mit verschiedenen flüchtigen Ionenpaarbildnern durch. Es zeigte sich, dass auch bei niedrigen Konzentrationen von Ammoniumheptafluorobutyrat in der mobilen Phase in Proben von Kugelfischen im Vergleich zum TTX-Standard die Ionenstärke durch Matrixeffekte um bis zu 80 % abnahm. Dieses Problem konnte durch Einsatz einer Säule mit Kationenaustauschereigenschaften und einer mobilen Phase bestehend aus wässriger Ammoniumacetatlösung und Methanol (75/25; v/v) gelöst werden [89].

Mit einer von Nakagawa et al. (2006) veröffentlichten Methode erfolgte die Analyse der TTXs durch chromatographische Separation mittels einer HILIC-Säule und anschließender massenspektrometrischer Detektion, wodurch die Quantifizierung von 11 verschiedenen TTX-Analoga einschließlich des fluoreszenzspektrometrisch nicht nachweisbaren 5,6,11-TrideoxyTTX ohne Verwendung von Ionenpaarbildnern möglich wurde [145].

Analog zur PSP-Toxinanalyse eignen sich für die chromatographische Trennung der TTXs ebenfalls ZIC-HILIC-Säulen. Diener et al. stellten 2007 eine empfindliche und selektive ZIC-HILIC-MS/MS-Methode unter Verwendung niedriger Pufferkonzentrationen und einem hohen organischen Anteil in der mobilen Phase, wodurch starke Ionisierungen und dementsprechend niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden, vor [146].

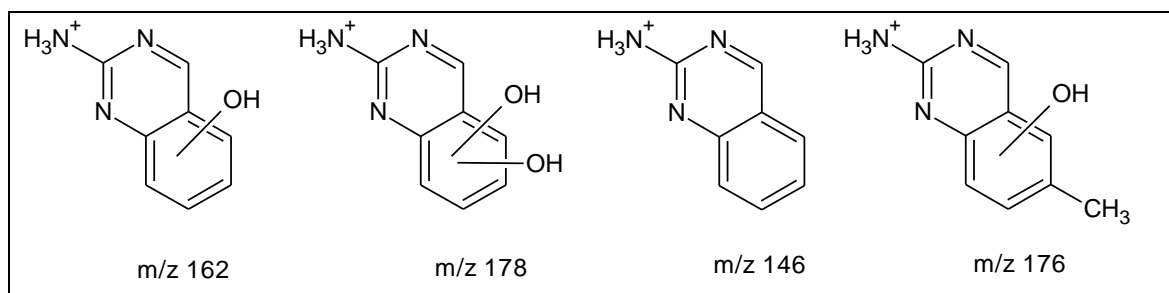
Ausgangslagen für die Fragmentierung der TTXs stellen die  $[M+H]^+$ -Ionen dar. Während der Fragmentierungen entstehen charakteristische Tochterionen durch Abspaltung von Wasser, Kohlenmonoxid und Teilen der Seitenketten (Tab. 2).

**Tab. 2: MRM-Übergänge der TTXs [143, 146]**

Toxine	$[M + H]^+$	MRM-Übergang			
		$m/z > m/z$			
TTX	320	320 > 256	320 > 162	320 > 178	320 > 284
4-epiTTX	320	320 > 256	320 > 284		
6-epiTTX	320	320 > 256	320 > 284		
4,9-AnhydroTTX	302	302 > 284	302 > 256	302 > 162	
6-epi-4,9-AnhydroTTX	302	302 > 284	302 > 256		
11-DeoxyTTX	304	304 > 258	304 > 148	304 > 164	304 > 176
5-DeoxyTTX	304	304 > 258	304 > 148	304 > 164	
11-norTTX-6,6-diol	306	306 > 242	306 > 178		
norTTX-6(S)-ol	290	290 > 244	290 > 162	290 > 178	
norTTX-6(R)-ol	290	290 > 244			
5,6,11-TrideoxyTTX	272	272 > 162	272 > 146		

Einige TTXs bilden das Fragment  $m/z$  162, dessen Ursprung möglicherweise 2-Amino-hydroxychinazolin ist, das durch Elimination der Bindung zwischen C8a und C9 und zwischen C6 und C11 und dem gleichzeitigen Abspalten von Wasser entstehen kann. Außerdem könnten 2-Aminodihydroxychinazolin ( $m/z$  178) und 2-Aminochinazolin ( $m/z$  146) der Ausgangspunkt weiterer Fragmente sein (Abb. 13).

11-DeoxyTTX besitzt im Gegensatz zu den Fragmenten  $m/z$  146 und  $m/z$  162 spezifische Ionen bei  $m/z$  148 und  $m/z$  164 (Tab. 2).

**Abb. 13: Mögliche Strukturen von Fragmenten der TTXs [143]**

### 3 ZIELSTELLUNGEN DER ARBEIT

Aufgrund eines steigenden weltweiten Warenaustauschs und einer durch globale Erwärmung bedingten Ausbreitung von Algenblüten in bisher weniger warme Gewässer werden zunehmend Vergiftungen durch den Verzehr von mit marinen Biotoxinen kontaminierten Lebensmitteln registriert, sodass hinsichtlich eines effektiven Verbraucherschutzes die Überwachung der Kontamination von Nahrungsmitteln marinen Ursprungs mit Biotoxinen unter besonderer Berücksichtigung von PSP-Toxinen und TTXs durch Festlegung und Überprüfung der Einhaltung von international verbindlichen rechtlichen Regelungen von großer Bedeutung ist.

Vor diesem Hintergrund sollten Untersuchungen bzgl. der Akkumulation und Metabolisierung von PSP-Toxinen in marinen Organismen, die Charakterisierung eines unbekannten PSP-Toxins und der Nachweis von PSP-Toxinen und TTXs in Kugelfischen auf der Grundlage einer leistungsfähigen LC-MS/MS-Methode zur schnellen simultanen und eindeutigen Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs durchgeführt werden. Auf folgende Experimente sollte fokussiert werden:

1. Untersuchung der Veränderungen des PSP-Toxinprofils von *Mytilus edulis* nach Intoxikation mit *Alexandrium ostenfeldii* und *Alexandrium minutum*

In einem *in vivo* Fütterungsversuch sollten die Akkumulation, Metabolisierung und Detoxifikation von PSP-Toxinen innerhalb der marinen Nahrungskette untersucht werden. Deshalb sollten unter kontrollierten Bedingungen toxische Algenkulturen an Miesmuscheln verfüttert werden.

2. Charakterisierung der vom Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii* gebildeten unbekannten PSP-Toxine

Nach Isolation eines unbekannten PSP-Toxins aus dem essigsauren Extrakt sowie der sauren Hydrolyse des Extraktes eines Strains von *Cylindrospermopsis raciborskii* sollte die Charakterisierung des Toxins erfolgen.

Hierzu sollten verschiedene massenspektrometrische Verfahren zur Bestimmung der Masse-zu-Ladungsverhältnisse und zur Ermittlung der Fragmentierungsmuster der unbekannten Substanzen eingesetzt werden.

3. Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs in Kugelfischen unterschiedlicher Herkunft

Unter Einsatz optimierter bzw. neu entwickelter HPLC-FLD-, LC-MS- und LC-MS/MS-Methoden sollte die eindeutige Identifizierung und quantitative Bestimmung von PSP-Toxinen sowie TTXs in verschiedenen Kugelfischproben erfolgen.

Die chromatographischen Trennungen der jeweiligen Toxine sollten auf Basis der hydrophilen Interaktionschromatographie und unter Verwendung analytischer ZIC-HILIC-Säulen durchgeführt werden.

4. Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-Methode zur simultanen Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs nach nur einem chromatographischen Lauf

Aufbauend auf den Arbeiten von Diener et al. zur getrennten Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs unter Einsatz von ZIC-HILIC-Säulen sollte eine LC-MS/MS-Methode zur simultanen Detektion aller lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine sowie der TTXs entwickelt werden.

Hinsichtlich der Untersuchung von Kugelfischen ist diese Methode von besonderer Bedeutung, da sowohl PSP-Toxine als auch TTXs in einigen Kugelfischarten vorhanden sein können.

Die Anwendbarkeit der Methode sollte anhand der Analytik von mit PSP-Toxinen und/oder TTXs kontaminierten Kugelfischen verschiedener Provenienz demonstriert werden.

## 4 EXPERIMENTELLER TEIL

### 4.1 Akkumulation und Metabolisierung der von *Alexandrium minutum* und *Alexandrium ostenfeldii* produzierten PSP-Toxine in der Miesmuschel *Mytilus edulis*

#### 4.1.1 Einleitung

In einem *in vivo* Fütterungsversuch sollte die Akkumulation und Metabolisierung von PSP-Toxinen durch Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) untersucht werden. Im Verlauf des Versuches an der Biologischen Anstalt des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung auf Helgoland wurden während der Intoxikationsphase die zwei Dinoflagellatenarten *Alexandrium ostenfeldii* und *Alexandrium minutum* unter gleichen kontrollierten Bedingungen an Miesmuscheln verfüttert. In einer sich daran anschließenden Detoxifikationsphase wurden die Muscheln entgiftet. Die PSP-Toxinkonzentrationen der Fütterungskulturen, der Miesmuscheln sowie des Hälterungswassers wurden mittels einer HPLC-FLD-Methode ermittelt.

#### 4.1.2 Versuchsdurchführung

##### 4.1.2.1 Probenmaterial

Die Untersuchungen wurden mit zwei PSP-toxinproduzierenden Strains durchgeführt. Der zu *Alexandrium minutum* zählende Strain CCMP-113 stammt aus der Ria de Vigo im Nordatlantik, Spanien, und wurde vom Bigelow Laboratory for Ocean Sciences in Maine, USA, bezogen, während der Strain AOTV-A4 der Art *Alexandrium ostenfeldii* von der Tvärminne Zoological Station der Universität Helsinki, Finnland, bereitgestellt wurde.

Die Stammkulturen wurden in F/2-Medien bei 20 PSU (AOTV-A4) bzw. 30 PSU (CCMP-113) kultiviert. Die Miesmuscheln *Mytilus edulis* stammten von Miesmuschelbänken des nordwestlichen Küstengebietes der Insel Helgoland.

4.1.2.2 Kultivierung von *A. ostenfeldii* und *A. minutum*

AOTV-A4 wurde bei 20 PSU und CCMP-113 bei 30 PSU in F/2-Kulturmedien angesetzt. Die Konzentrationen der Nährstoffkomponenten des Mediums sind in Tab. 3 dargestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 14 °C, einem 14h/10h Licht-/Dunkel-Regime und einer Lichtintensität von  $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ .

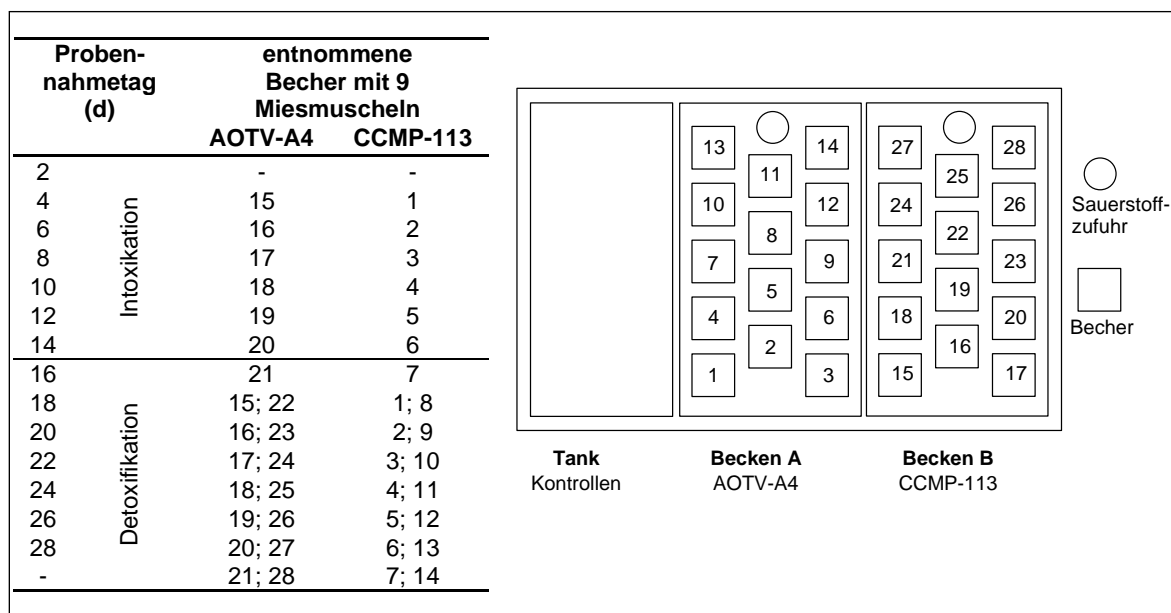
**Tab. 3: Konzentrationen der Nährstoffkomponenten des F/2-Mediums [147]**

Nährstoffkomponenten	Stammlösung (g L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	75
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	5
<i>Metallmix</i>	
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	9,8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	6,3
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	22,0
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,0
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	18,0
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	-
NiSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	-
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	-
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	-
<i>Vitaminmix</i>	
Vitamin B12	1,0
Biotin	0,1

4.1.2.3 *In vivo* Fütterungsversuch

## 4.1.2.3.1 Versuchsdurchführung

Die Miesmuscheln wurden auf 14 Becher zu je 9 Stück verteilt und jeweils 14 Becher in zwei Hälterungsbecken (Becken A und B) eingesetzt, welche mit ca. 25 L ungefiltertem und mit Sauerstoff versetztem Seewasser gefüllt waren. Zusätzlich wurden in einem Tank mit kontinuierlichem Zu- und Ablauf von Seewasser Miesmuscheln als Kontrollen gehalten (Abb. 14). Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen erfolgte bei jeder Probenentnahme die Bestimmung der Temperatur und des Sauerstoffgehaltes der Hälterungsbecken und des Kontrolltanks (Anhang Tab. 25 und 26).



**Abb. 14: Schema zum Versuchsaufbau und Probenentnahme**

Das *in vivo* Fütterungsexperiment gliederte sich in eine jeweils zweiwöchige Intoxikations- und Detoxifikationsphase. Während der Intoxikation wurden die Miesmuscheln in den Hälterungsbecken mit 5 L CCMP-113- bzw. 3,8 L AOTV-A4-Kultur gefüttert. Die Probenentnahmen wurden während des gesamten Experimentes im zweitägigen Rhythmus durchgeführt. Dem Probenentnahmeschema entsprechend entnahm man 9 Individuen aus den jeweiligen Bechern sowie 9 Miesmuscheln aus dem Kontrolltank. Zur Analyse des Hälterungswasser wurden die ersten 5 Liter zur Analyse des Filtrationswassers und die letzten 5 Liter zur Analyse des Wassers, welches vorrangig Sedimente und Exkremente enthielt, über GF/C-Filter filtriert und im Anschluss die Becken wieder mit Seewasser gefüllt. Die entnommenen Miesmuscheln wurden durch Muscheln aus dem Kontrolltank ersetzt, sodass die Anzahl in den Hälterungsbecken stets konstant blieb. Die nachgesetzten Muscheln waren kein Bestandteil der folgenden Untersuchungen.

Während der Detoxifikationsphase erfolgte die Zugabe von toxinfreiem Futterplankton sowohl zu den Miesmuscheln im Tank als auch zu den Hälterungsbecken. Es wurde weiterhin analog dem Schema jeweils ein Becher aus den Hälterungsbecken entnommen, welcher die gesamte Intoxikationsphase durchlaufen hatte, sowie der Reihe nach ein Becher, der nachgesetzte Miesmuscheln enthielt, sodass sich nach der siebten Probenentnahme keine Miesmuscheln mehr in den Bechern befanden.

#### 4.1.2.3.2 Extraktion des Probenmaterials

Zur Bestimmung der PSP-Toxine in den Kulturen wurden jeden zweiten Tag jeweils 90 mL Kulturmedium von AOTV-A4 bzw. CCMP-113 über GF/C-Filter filtriert und diese anschließend in 1,5 mL 0,03 M Essigsäure aufgenommen. Nach 30 minütigem Aufschluss im Ultraschallbad, Zentrifugation bei 12000 rpm und Filtration durch 0,45 µm Nylon-Spritzenfilter wurde der Überstand bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren. Die Extraktion der im Hälterungswasser vorhandenen PSP-Toxine erfolgte analog.

Zur Bestimmung der PSP-Toxine in den Miesmuscheln wurde während des Experimentes jeden zweiten Tag jeweils ein Becher aus dem Becken A und B entnommen. Die 9 Miesmuscheln eines Bechers wurden vermessen, präpariert, gefriergetrocknet, homogenisiert und anschließend in Dreierparallelen mit jeweils 650 mg in 4 mL 0,03 M Essigsäure 30 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach zweifacher Zentrifugation bei 5000 rpm und Filtration durch 0,45 µm Nylon-Spritzenfilter wurde der Überstand bei -20 °C bis zur Analyse tiefgefroren.

#### 4.1.2.4 Bestimmung der Gehalte an PSP-Toxinen mittels HPLC-FLD

##### 4.1.2.4.1 Das HPLC-System

Die Bestimmung der PSP-Toxine erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion entsprechend der Methode von Diener et al. (2006), welche eine vollständige Separation aller relevanten PSP-Toxine ermöglicht [136]. Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma JASCO, ausgestattet mit einer Reaktionseinheit (Pickering Laboratories) und zwei für die Nachsäulenderivatisierung notwendigen Pumpen (Shimadzu) eingesetzt.

##### 4.1.2.4.2 HPLC-Bedingungen

Zur chromatographischen Trennung der PSP-Toxine wurde eine Luna-Säule C18 (2) (5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm; Phenomenex) unter Einsatz einer Gradientenelution mit einem binären Eluentengemisch bei einem Fluss von 1 mL min<sup>-1</sup> verwendet. Mit Phosphorsäure wurde der pH-Wert der Eluenten auf pH 7,0 eingestellt. In Tab. 4 sind die Eluentenzusammensetzungen und das Gradientenprogramm der HPLC-Analyse dargestellt. Zur Identifikation und Quantifizierung der PSP-Toxine wurden Standards für GTX1-4, dcGTX2/3, Neo, dcSTX und STX eingesetzt.



**Tab. 4: Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die HPLC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen nach Diener et al. (2006) [136]**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	6 mM Oktansulfonsäure 6 mM Heptansulfonsäure 40 mM Ammoniumphosphat, 0,75 % Tetrahydrofuran in Wasser (v/v)	7 mM Oktansulfonsäure 7 mM Heptansulfonsäure 48 mM Ammoniumphosphat 1 % Tetrahydrofuran in 10 % Acetonitril / 90 % Wasser (v/v)
0	100	0
15	100	0
16	0	100
50	0	100
51	100	0
72	100	0

#### 4.1.2.4.3 Nachsäulenderivatisierung und Detektion

Die Derivatisierung der PSP-Toxine erfolgte mit einer CRX400 Reaktionseinheit (TFE Teflon coil, 15 m x 0,3 mm id (1,0 mL); Pickering Laboratories) bei 50 °C durch Zugabe von 10 mM Periodsäure und 550 mM Ammoniaklösung zur Oxidation der Toxine und dem anschließenden Ansäuern mit 0,75 M Salpetersäure auf einen pH-Wert von 2 bis 3 (jeweils Fluss von 0,4 mL min<sup>-1</sup>). Zur Fluoreszenzdetektion der oxidierten PSP-Toxine wurde die Extinktionswellenlänge auf 330 nm und die Emissionswellenlänge auf 395 nm eingestellt.

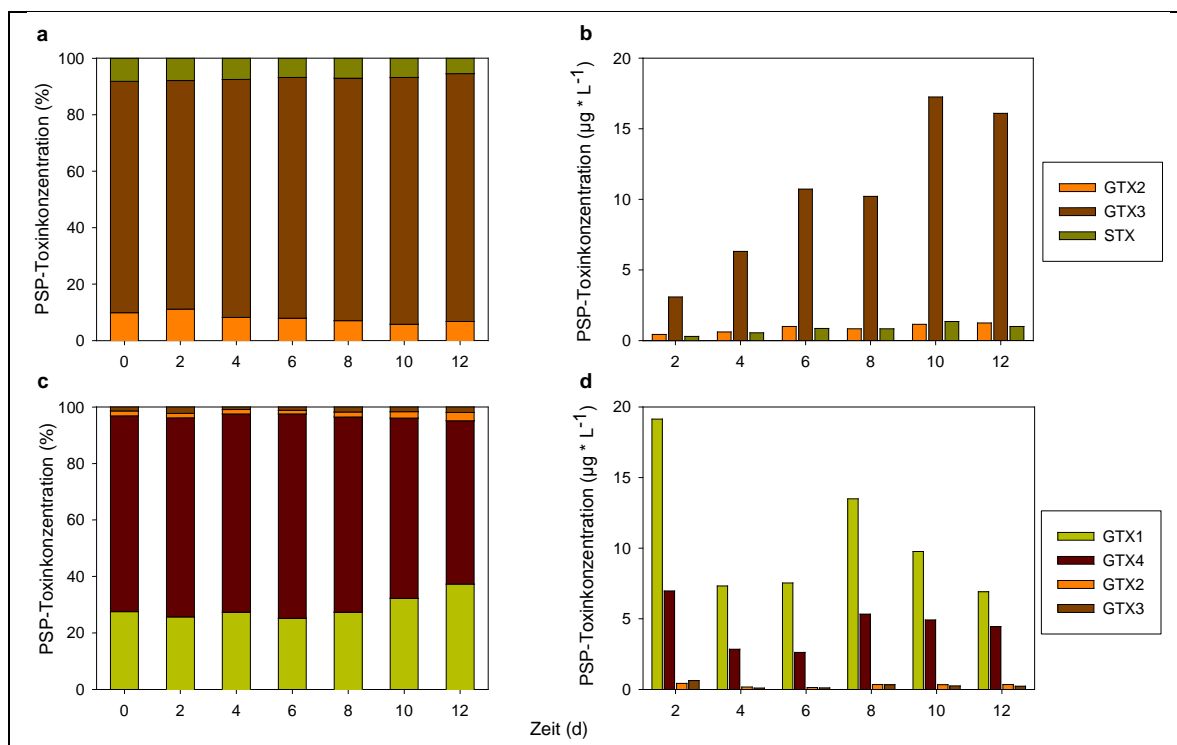
### 4.1.3 Ergebnisse

#### 4.1.3.1 Konzentrationen an PSP-Toxinen und Toxinprofile der Kulturen

Das PSP-Toxinprofil des Strains AOTV-A4 wurde 2009 von Kremp et al. beschrieben [18], und es ist vergleichbar mit den Ergebnissen des vorliegenden Experimentes. Es wird durch GTX3 (85 %) dominiert, während die Anteile an GTX2 (8 %) und STX (7 %) geringer waren. Die durchschnittlichen Toxinkonzentrationen der während der Intoxikation verfütterten Kultur AOTV-A4 lagen bei 9,6 µg L<sup>-1</sup> GTX3 und jeweils 0,8 µg L<sup>-1</sup> GTX2 und STX. Die PSP-Toxinkonzentrationen von AOTV-A4 stiegen während der Intoxikationsphase an und erreichten die höchsten Werte für GTX3 (17,3 µg L<sup>-1</sup>) und STX (1,4 µg L<sup>-1</sup>) am 10. Tag sowie für GTX2 (1,3 µg L<sup>-1</sup>) am 12. Tag.

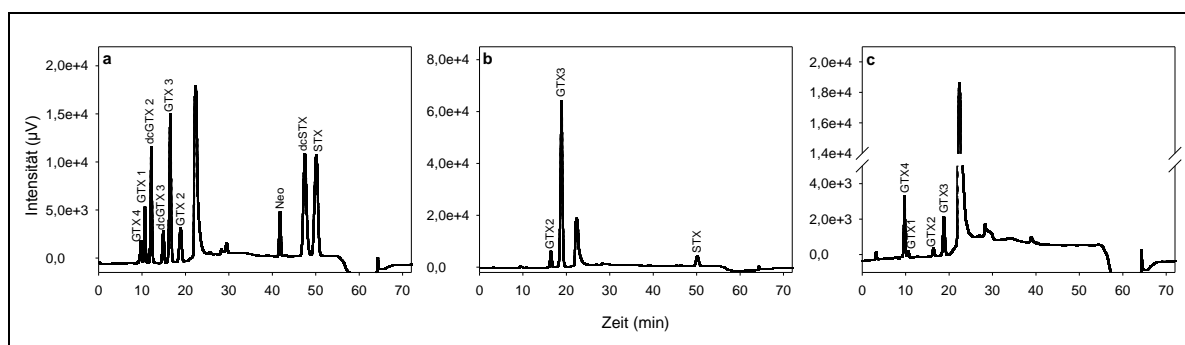
Das PSP-Toxinprofil der Fütterungskultur CCMP-113 wurde von GTX1 (29 %) und GTX4 (68 %) dominiert, enthielt lediglich in geringen Anteilen GTX2 (2 %) sowie GTX3 (1 %) und war vergleichbar mit den Ergebnissen von Flynn et al., welche in CCMP-113 20 bis

30 % GTX1, 60 % GTX4 und als Minorkomponenten GTX2 und GTX3 nachgewiesen hatten [25]. Während der Intoxikationsphase betrugen die durchschnittlichen Konzentrationen  $4,8 \mu\text{g L}^{-1}$  GTX1,  $11,5 \mu\text{g L}^{-1}$  GTX4,  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  GTX2 und  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  GTX3. Im Vergleich zu AOTV-A4 nahmen die Konzentrationen von CCMP-113 während der Intoxikationsphase ab (Abb. 15).



**Abb. 15: PSP-Toxinprofil (a) und PSP-Toxinkonzentrationen (b) von AOTV-A4 sowie PSP-Toxinprofil (c) und PSP-Toxinkonzentrationen (d) von CCMP-113 während der Intoxikationsphase**

Die Messwerte für PSP-Toxinkonzentrationen und die Toxinverteilungen sind im Anhang in den Tab. 27 und 28 aufgeführt. In Abb. 15 sind die Chromatogramme der HPLC-FLD-Analysen beider Kulturen und eines PSP-Standardmixes dargestellt.



**Abb. 16: Chromatogramme eines PSP-Standardmixes (a) und der Kulturen AOTV-A4 (b) und CCMP-113 (c)**

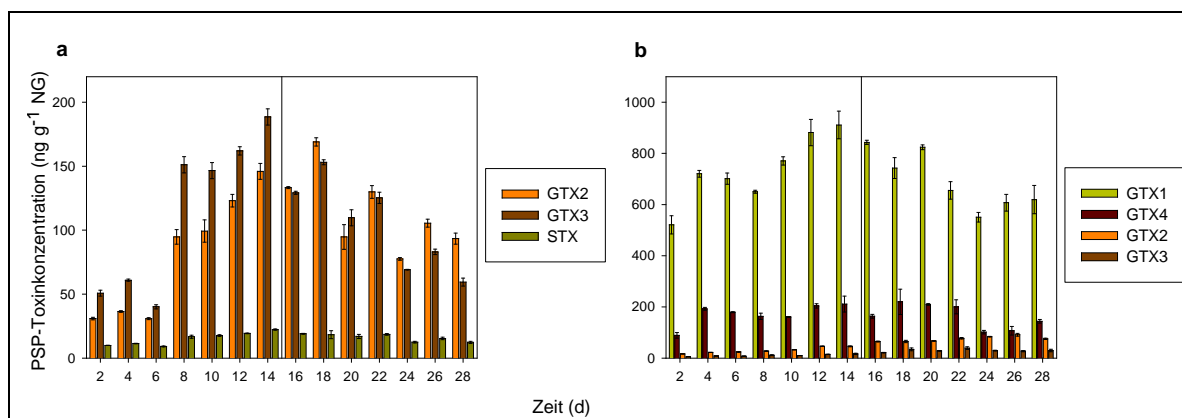
#### 4.1.3.2 Akkumulation von PSP-Toxinen in Miesmuscheln

Die Abmessungen der Miesmuscheln in den Hälterungsbecken und im Tank blieben während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase mit einer Länge von  $4,0 \pm 0,1$  cm und einer Breite von  $2,1 \pm 0,1$  cm annähernd konstant. Das durchschnittliche Nassgewicht betrug  $18,4 \pm 2,4$  g (Anhang Tab. 29 und 30).

Die Zusammensetzung der PSP-Toxine in den Miesmuscheln entsprach denen der Fütterungskulturen AOTV-A4 (GTX2, GTX3 und STX) und CCMP-113 (GTX1-GTX4). Die Bestimmung der PSP-Toxinkonzentrationen in  $\text{ng g}^{-1}$  NG (Nassgewicht) erfolgte mittels HPLC-FLD.

Die mit AOTV-A4 gefütterten Miesmuscheln zeigten während der Intoxikationsphase einen durch das exponentielle Wachstum dieser Kulturen verursachten kontinuierlichen Anstieg der PSP-Toxinkonzentrationen und betrugen am letzten Tag  $146 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX2,  $189 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX3 und  $22 \text{ ng g}^{-1}$  NG STX (Abb. 17a). In der sich anschließenden zweiwöchigen Detoxifikationsphase konnte keine kontinuierliche Abnahme der Toxine in den Muscheln beobachtet werden. Die Konzentrationen schwankten und erreichten die niedrigsten Werte am letzten Tag des Experimentes ( $94 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX2,  $60 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX3 und  $12 \text{ ng g}^{-1}$  NG STX).

In Abb. 17b sind die ermittelten PSP-Toxinkonzentrationen in den Miesmuscheln während der Intoxikation mit CCMP-113 und der anschließenden Detoxifikation dargestellt. Während der Intoxikation erreichten alle PSP-Toxine am 14. Tag die höchsten Konzentrationen ( $211 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX4,  $911 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX1,  $46 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX2 und  $17 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX3). Der Konzentrationsanstieg in den mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln war im Vergleich zur Intoxikation mit AOTV-A4 niedriger. Begründet werden kann dies durch eine schwächere Wachstumszunahme der Fütterungskultur CCMP-113 aufgrund der schon eingetretenen stationären Wachstumsphase. Während der Detoxifikationsphase sanken die Konzentrationen der in den Miesmuscheln akkumulierten Toxine auf  $144 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX4,  $619 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX1,  $75 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX2 und  $30 \text{ ng g}^{-1}$  NG GTX3 am letzten Tag des Experimentes. Bei GTX2 und GTX3 konnten am Ende der Detoxifikationsphase höhere Konzentrationen ermittelt werden als am Ende der Intoxikationsphase, was durch einen später beschriebenen Transformationsprozess erklärbar ist.



**Abb. 17: PSP-Toxinkonzentrationen in *M. edulis* nach Fütterung mit AOTV-A4 (a) und CCMP-113 (b) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase**

Die Messwerte der PSP-Toxinkonzentrationen und die Toxinverteilungen in den Miesmuscheln sind im Anhang in den Tab. 31 bis 34 aufgeführt.

Eine Analyse der Kontrollmiesmuscheln zeigte kein Vorhandensein von PSP-Toxinen, sodass eine Kontamination der für das *in vivo* Fütterungsexperiment verwendeten Muscheln über das Seewasser ausgeschlossen werden kann.

Bei *in vivo* Fütterungsversuchen sind die zur Akkumulation verfügbaren Toxin-konzentrationen stets abhängig von den Zellkonzentrationen der Kulturen. Während natürlicher Algenblüten wird der Grenzwert von 800 µg STXeq. kg<sup>-1</sup> Muschelfleisch sehr schnell erreicht. Mit CCMP-113 gefütterte Miesmuscheln überschritten diesen bereits am zweiten Tag des Versuches, eine Unterschreitung wurde erst wieder am 24. Tag beobachtet.

Der Grenzwert von 800 µg STXeq. kg<sup>-1</sup> Muschelfleisch [54] wurde während des Experimentes nach Fütterung mit AOTV-A4 nicht überschritten.

Die höhere Toxizität von Muscheln nach Intoxikation mit CCMP-113 im Vergleich zu AOTV-A4 war durch eine höhere Zellkonzentration in der Fütterungskultur bedingt. Aufgrund höherer Toxinkonzentrationen im Hälterungswasser von mit AOTV-A4 gefütterten Miesmuscheln lässt sich ebenfalls vermuten, dass die PSP-Toxine entweder in geringeren Mengen von den Muscheln akkumuliert oder schneller wieder ins Wasser abgegeben wurden (Tab. 5).

**Tab. 5: Gesamttoxizitäten in  $\mu\text{g STXeq. kg}^{-1}$  der Fütterungskulturen AOTV-A4 und CCMP-113**

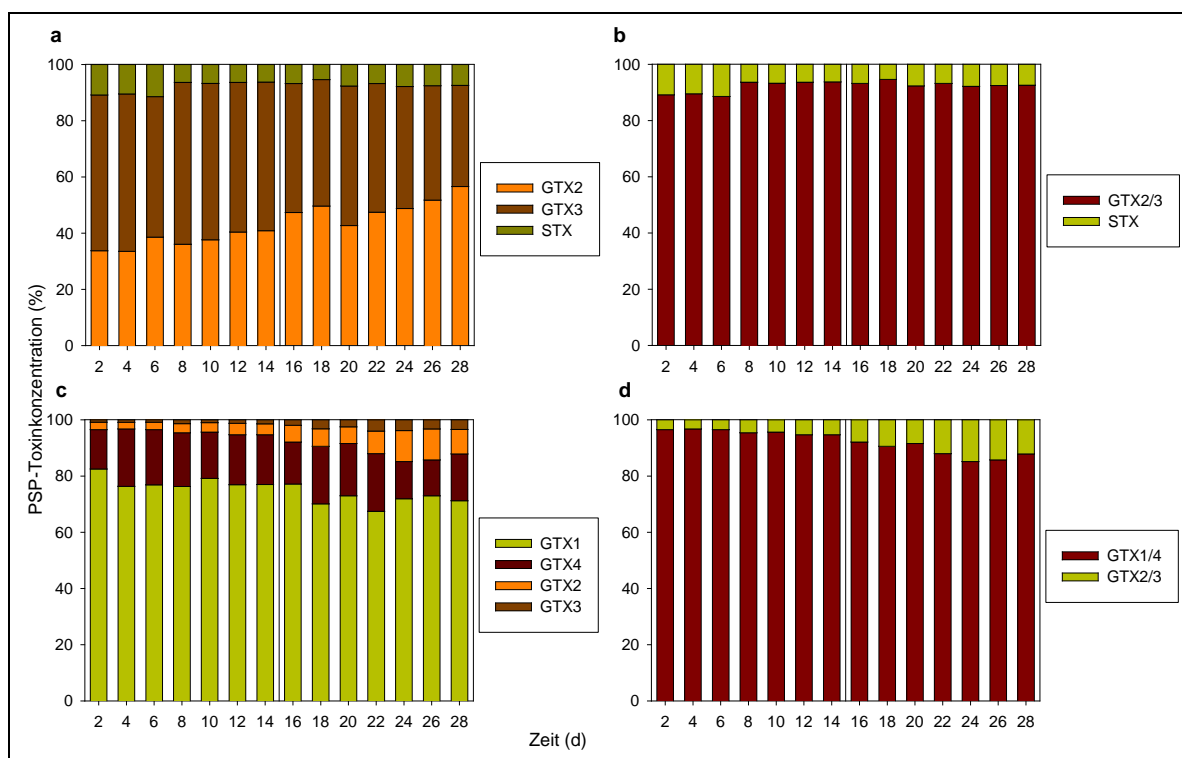
Probennahmetag (d)	Gesamttoxizität AOTV-A4	Gesamttoxizität CCMP-113
2	53	591
4	63	869
6	46	841
8	145	782
10	145	902
12	166	1051
14	198	1088
16	150	997
18	178	944
20	121	1015
22	146	850
24	85	673
26	107	735
28	85	768

#### 4.1.3.3 Metabolismus von PSP-Toxinen in Miesmuscheln

Im Vergleich zu anderen Schalentieren findet der PSP-Toxinmetabolismus in Miesmuscheln in begrenzterem Umfang statt [148-150]. Eine in diesem Experiment beobachtbare Form der Metabolisierung ist die Epimerisierung durch Keto-Enol-Tautomerisierung. In der Fütterungskultur AOTV-A4 wurde das Toxinprofil durch das  $\beta$ -Epimer GTX3 dominiert, während das  $\alpha$ -Epimer GTX2 nur in geringen Konzentrationen vorhanden war. Nach Akkumulation in den Miesmuscheln veränderte sich das Profil jedoch, sodass bereits am zweiten Versuchstag der Anteil von GTX3 auf 51 % sank und am letzten Tag lediglich 36 % betrug. Im Gegensatz hierzu erhöhte sich der Anteil von GTX2 kontinuierlich und erreichte am letzten Tag des Experimentes 57 %. Beim Vergleich der zusammengefassten Anteile der akkumulierten PSP-Toxine GTX2/GTX3 mit STX zeigte sich ein konstantes Verhältnis (Abb. 18a und b).

Im Unterschied zum Toxinprofil der Fütterungskultur CCMP-113 konnten in den Miesmuscheln bereits am zweiten Tag der Intoxikationsphase höhere Konzentrationen des thermostabileren  $\alpha$ -Epimer GTX1 (83 %) im Vergleich zu dem in den Kulturen dominant vorkommenden  $\beta$ -Epimer GTX4 nachgewiesen werden. Während des gesamten Experimentes blieben die Anteile von GTX1 und GTX4 relativ stabil und betrugen am letzten Tag 77 bzw. 17 %. Die Anteile von GTX2 und GTX3 nahmen während der Intoxikation zu und erreichten Werte von 4 bzw. 1 %.

Während der Detoxifikationsphase setzte sich der Anstieg beider Toxine bis zum 24. Tag auf 11 % GTX2 und 4 % GTX3 fort und sank schließlich auf 8 % GTX2 und 3 % GTX3 am letzten Tag ab. Interessanterweise fand ein Reduktionsprozess statt. Die Anteile von PSP-Toxinen mit einer N1-OH-Gruppe (GTX1 und GTX4) nahmen ab, während sich die der Toxine mit einer N1-H-Gruppe (GTX2 und GTX3) erhöhten. Der Anteil von GTX1/GTX4 als Summe betrug am Anfang des Experimentes 97 % und sank auf 88 % ab, während sich der Anteil von GTX2/GTX3 von 3 auf 12 % erhöhte (Abb. 18c und d).



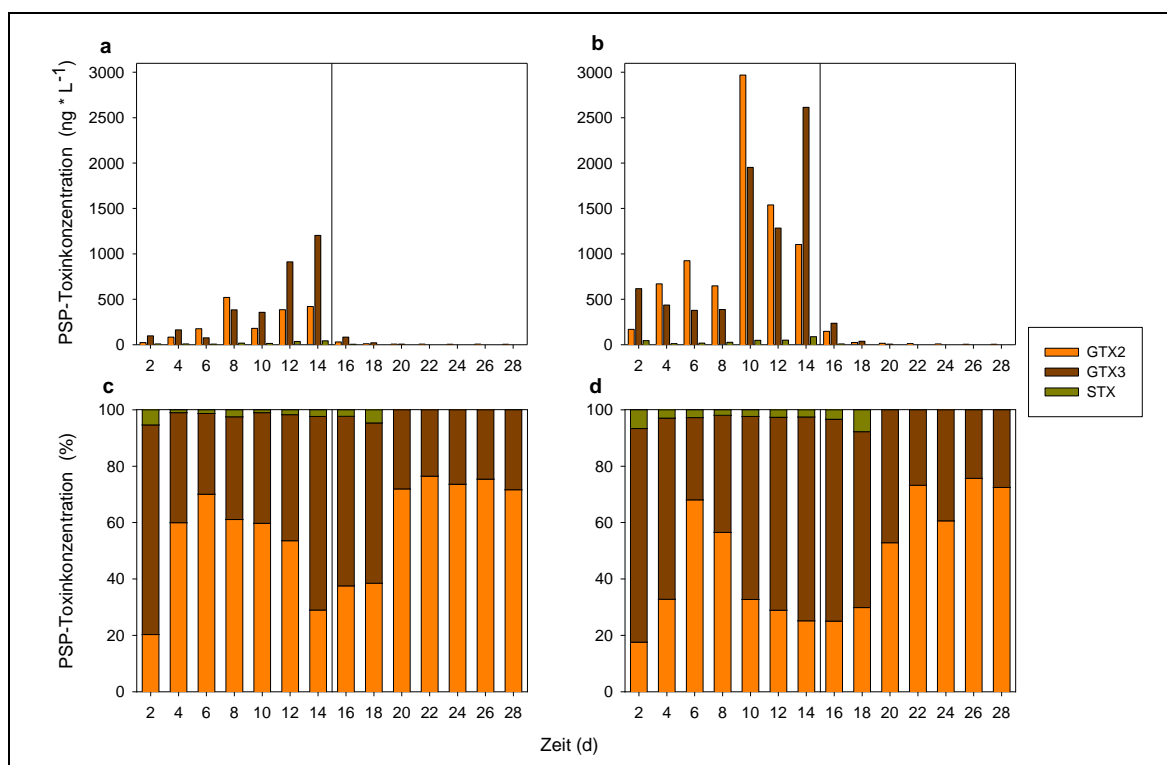
**Abb. 18: Prozentuale Verteilung der PSP-Toxine in *M. edulis* nach Fütterung mit AOTV-A4 (a und b) sowie CCMP-113 (c und d) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase**

#### 4.1.3.4 Analyse des Hälterungswassers

Parallel zur Analyse des Toxinmetabolismus von Miesmuscheln nach Fütterung mit AOTV-A4 bzw. CCMP-113 wurden die PSP-Toxinkonzentrationen in  $\text{ng L}^{-1}$  im Filtrationswasser und im Wasser, welches die Sedimente und Exkremente enthielt, untersucht. Die Messwerte der PSP-Toxinkonzentrationen und die Toxinverteilungen im Hälterungswasser sind im Anhang in den Tab. 35 bis 38 dargestellt.

Im Filtrationswasser der mit AOTV-A4 gefütterten Miesmuscheln konnten die höchsten Konzentrationen an PSP-Toxinen am letzten Tag der Intoxikationsphase ermittelt werden ( $1203 \text{ ng L}^{-1}$  GTX3,  $419 \text{ ng L}^{-1}$  GTX2,  $42 \text{ ng L}^{-1}$  STX), während im Wasser mit den Sedimenten und Exkrementen die höchsten Werte am 10. Tag ( $2970 \text{ ng L}^{-1}$  GTX2) bzw.

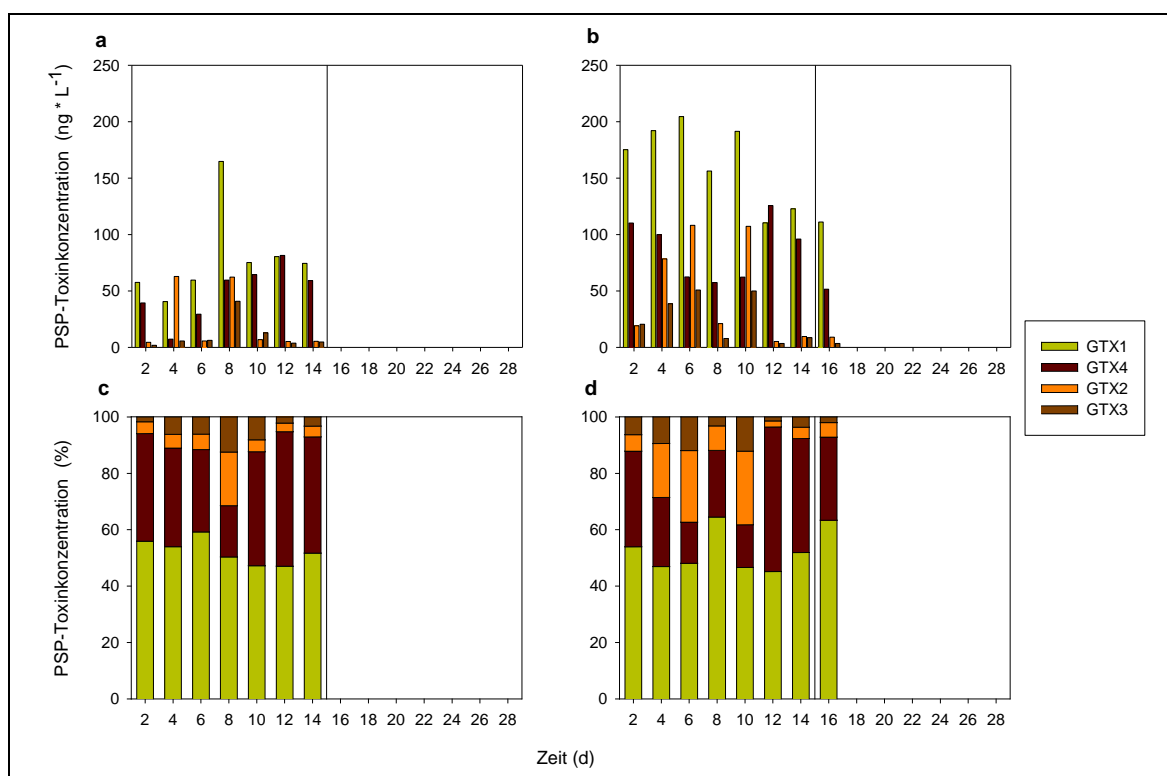
am 14. Tag ( $2970 \text{ ng L}^{-1}$  GTX3,  $89 \text{ ng L}^{-1}$  STX) erreicht wurden. Während der Detoxifikationsphase nahmen die Toxinkonzentrationen kontinuierlich ab, sodass ab dem 20. Tag kein STX mehr detektiert wurde. Das Toxinprofil änderte sich im Verlauf des Experimentes, blieb aber stets zwischen dem Filtrationswasser und dem Wasser mit den Exkrementen und Sedimenten vergleichbar. Die Konzentration des in der Kultur AOTV-A4 dominierenden GTX3 nahm im Wasser ab, während der Gehalt von GTX2, dem Haupttoxin in den Miesmuscheln, anstieg (Abb. 19).



**Abb. 19: Konzentrationen an PSP-Toxinen in *M. edulis* nach Fütterung mit AOTV-A4 im Filtrationswasser (a und c) und im Wasser mit den Sedimenten und Exkrementen (b und d) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase**

Im Filtrationswasser der mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln waren im Vergleich zu AOTV-A4 geringere Toxinkonzentrationen detektierbar. Für GTX1 ( $165 \text{ ng L}^{-1}$ ), GTX2 ( $63 \text{ ng L}^{-1}$ ) und GTX3 ( $41 \text{ ng L}^{-1}$ ) wurden am 8. Tag und für GTX4 ( $81 \text{ ng L}^{-1}$ ) am 12. Tag die größten Werte ermittelt. Für die Toxinkonzentrationen im Wasser, welches die Sedimente und Exkremente beinhaltete, lagen die höchsten Werte für GTX1 ( $204 \text{ ng L}^{-1}$ ), GTX2 ( $108 \text{ ng L}^{-1}$ ) und GTX3 ( $51 \text{ ng L}^{-1}$ ) am 8. Tag und für GTX4 ( $126 \text{ ng L}^{-1}$ ) am 10. Tag vor. Im Verlauf der Detoxifikationsphase konnten bereits ab dem 16. Versuchstag keine PSP-Toxine mehr im Wasser nachgewiesen werden. Das Toxinprofil im Hälterungswasser der mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln zeigte sich ebenfalls sehr

inhomogen, jedoch blieb das in den Muscheln dominierende GTX1 die Hauptkomponente (Abb. 20).



**Abb. 20:** Konzentrationen an PSP-Toxinen in *M. edulis* nach Fütterung mit CCMP-113 im Filtrationswasser (a und c) und im Wasser mit den Sedimenten und Exkrementen (b und d) während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase

#### 4.1.4 Diskussion der Ergebnisse

In einem *in vivo* Experiment wurde die Akkumulation und der Metabolismus von PSP-Toxinen in *M. edulis* nach Intoxikation mit *A. ostentfeldii* (Strain AOTV-A4) bzw. *A. minutum* (Strain CCMP-113) untersucht.

Im Verlauf der Intoxikationsphase erhöhten sich die PSP-Toxinkonzentrationen der Fütterungskultur AOTV-A4 stark, was auf ein exponentielles Wachstum dieser Kultur hinweist, und dementsprechend waren hohe Toxinkonzentrationen zur Aufnahme in *M. edulis* verfügbar. Im Gegensatz zu AOTV-A4 verringerten sich die Toxinkonzentrationen von CCMP-113, da sich diese Kultur bereits in der stationären Wachstumsphase befand. Die in den Miesmuscheln nachgewiesenen PSP-Toxine stimmten mit denen der Fütterungskulturen überein (GTX2, GTX3, STX in AOTV-A4 und *M. edulis*; GTX1-GTX4 in CCMP-113 und *M. edulis*), jedoch änderte sich das Toxinprofil. Die Kultur AOTV-A4 enthielt vorrangig das  $\beta$ -Epimer GTX3, während im Verlauf des Experimentes der Anteil



an in den Miesmuscheln akkumuliertem thermodynamisch stabilerem  $\alpha$ -Epimer GTX2 durch Epimerisierungsprozesse stark zunahm. Allerdings lässt das  $\alpha : \beta$ -Verhältnis von 1,6 : 1 am letzten Versuchstag den Schluss zu, dass der Epimerisierungsprozess noch nicht abgeschlossen war. In mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln war der gleiche Effekt beobachtbar. Während in der Kultur vorrangig GTX4 nachgewiesen werden konnte, stieg der Anteil von GTX1 nach Akkumulation in den Muscheln stark an.

Ein weiterer Metabolisierungsprozess wurde in Miesmuscheln nach Intoxikation mit CCMP-113, jedoch nicht mit AOTV-A4 nachgewiesen. Der Anteil von PSP-Toxinen mit einer N1-OH-Gruppe (GTX1 und GTX4) verringerte sich in Korrelation mit einer Zunahme von Toxinen, welche eine N1-H-Gruppe im Molekül besitzen (GTX2 und GTX3). Diese Veränderungen in der Toxinzusammensetzung weisen auf einen reduktiven Transformationsprozess hin. Die Verhältnisse zwischen GTX1 und GTX4 (4,3 : 1) sowie zwischen GTX2 und GTX3 (2,6 : 1) blieb während des Versuches annähernd konstant.

Die Ergebnisse der Reduktion von N1-OH-Gruppen in *M. edulis* nach Fütterung mit CCMP-113 sind vergleichbar mit einer Untersuchung von Blanco et al. (2003), in welcher *M. galloprovincialis* ebenfalls mit CCMP-113 gefüttert worden war [151].

In den mit AOTV-A4 gefütterten Miesmuscheln blieb das Verhältnis von GTX2/GTX3 zu STX relativ konstant, sodass eine reduktive Transformation der Sulfatgruppe ebenso wie in den mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln ausgeschlossen werden kann.

Sowohl die mit AOTV-A4 als auch die mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln zeigten während der Intoxikationsperiode eine schnelle Akkumulation der PSP-Toxine, wobei während der Detoxifikationsphase nur eine langsame und während des Versuches noch nicht abgeschlossene Entgiftung beobachtbar war. Verschiedene Akkumulationsexperimente in der Vergangenheit ergaben ebenfalls, dass nach zweiwöchiger Detoxifikation die Entgiftung noch nicht beendet ist [151, 152].

Die Detoxifikationsphase war durch eine Abgabe der PSP-Toxine aus den Miesmuscheln in das Hälterungswasser gekennzeichnet, wobei eine erneute Filtration und Akkumulation der Toxine aus dem Wasser in die Muscheln ebenfalls eine Ursache dafür sein kann, dass nach Versuchsende noch PSP-Toxine in den Muscheln detektierbar waren.

Im Hälterungswasser konnten dieselben PSP-Toxine wie in den entsprechenden Fütterungskulturen und Miesmuscheln detektiert werden, jedoch veränderte sich deren Anteil im Verlauf des Experimentes. Die Toxinprofile des Filtrationswassers und des Wassers mit den Exkrementen und Sedimenten waren während der gesamten Zeit vergleichbar, jedoch enthielt letzteres wesentlich höhere Toxinkonzentrationen aufgrund

des Absetzens der Fütterungskulturen sowie dem Vorhandensein größerer Mengen an Ausscheidungsprodukten.

Beim Vergleich der Toxinkonzentrationen der Hälterungswässer wurde stets ein höherer Gehalt im Wasser der mit AOTV-A4 im Vergleich zu mit CCMP-113 gefütterten Miesmuscheln ermittelt, jedoch waren die akkumulierten Konzentrationen in den Muscheln geringer. Es lässt sich vermuten, dass die Miesmuscheln die Toxine der Fütterungskultur AOTV-A4 schwächer akkumulierten weil auch die verfügbare Biomasse der Kultur AOTV-A4 geringer war.

## **4.2 Bildung unbekannter PSP-Toxine durch das Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii***

### **4.2.1 Einleitung**

Im Phytoplankton des Süßwassers dominieren meist Cyanobakterien. Diese prokaryotischen Organismen sind zur Produktion einer Vielzahl von Toxinen in der Lage. Neben Microcystinen (MCs) und Nodularinen (NODs), die den Hepatotoxinen zugeordnet werden, kann die Bildung von hepato- und cytotoxischen Toxinen wie Cylindrospermopsinen (CYNs) sowie von neurotoxischen Toxinen wie Anatoxinen (ANAs) und PSP-Toxinen erfolgen.

*Cylindrospermopsis raciborskii* ist eine Cyanobakterienspezies, welche zur Bildung von CYNs als auch von PSP-Toxinen fähig ist [11, 153, 154]. Bereits 2002 berichteten Molica et al. über ein neu entdecktes Saxitoxinanalogon in ITEP-018, einem Strain von *Cylindrospermopsis raciborskii* aus Brasilien [155]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein unbekanntes PSP-Toxin aus *Cylindrospermopsis raciborskii* isoliert werden, um eine eventuelle Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Molica et al. zu überprüfen und um gegebenenfalls weitere Experimente zur Strukturaufklärung durchzuführen.

### **4.2.2 PSP-Standardsubstanzen**

Es wurden PSP-Toxinstandards für GTX1-4 eingesetzt.

### **4.2.3 Probenmaterial**

Zur Isolation und Identifizierung der unbekannten PSP-Toxine wurden im Jahr 2006 gefriergetrocknete Extrakte des Strains ITEP-018 verwendet. Weitere Analysen erfolgten mit Extrakten (0,03 M Essigsäure) der Strains ITEP-028, ITEP-A1 und Jucaz aus Brasilien sowie mit den brasilianischen Strains ITEP-A1 und PMC 00.01, welche am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven kultiviert wurden.

#### **4.2.4 Extraktion des Probenmaterials**

Jeweils 100 mg der gefriergetrockneten Biomasse des Strains ITEP-018 wurde in Eppendorf-Tubes eingewogen, mit 1 ml 0,03 M Essigsäure versetzt, 1 min gevortext, 1 min mit dem Ultraschallstab sowie 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen und 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand über 0,45 µm Nylon-Spritzenfilter filtriert und in HPLC-Vials überführt.

Zur Herstellung von Hydrolyseextrakten wurde 150 µL des 0,03 M Essigsäureextraktes mit 37 µL 1 M Salzsäure versetzt, 1 min gevortext, anschließend für 15 min bei 90 °C erhitzt und nach Abkühlung 75 µL Natriumacetat zugegeben.

#### **4.2.5 Isolation der unbekannten Substanzen**

##### **4.2.5.1 Die HPLC-Systeme**

Die Isolierung der gesuchten Substanz sowie seines Hydrolyseproduktes aus Extrakten des Strains ITEP-018 erfolgte mittels einer ZIC-HILIC-Säule (5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm) an einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu entsprechend der Methode von Diener et al. [140]. Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen wurde diese HPLC-Anlage in Kombination mit einer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Aufgrund eines wesentlich geringeren Verbrauches an Acetonitril wurden zusätzlich Analysen mittels Ionenpaarchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion gemäß der Methode von Diener et al. [136] mit dem in Tab. 4 beschriebenen Gradientenprogramm durchgeführt.

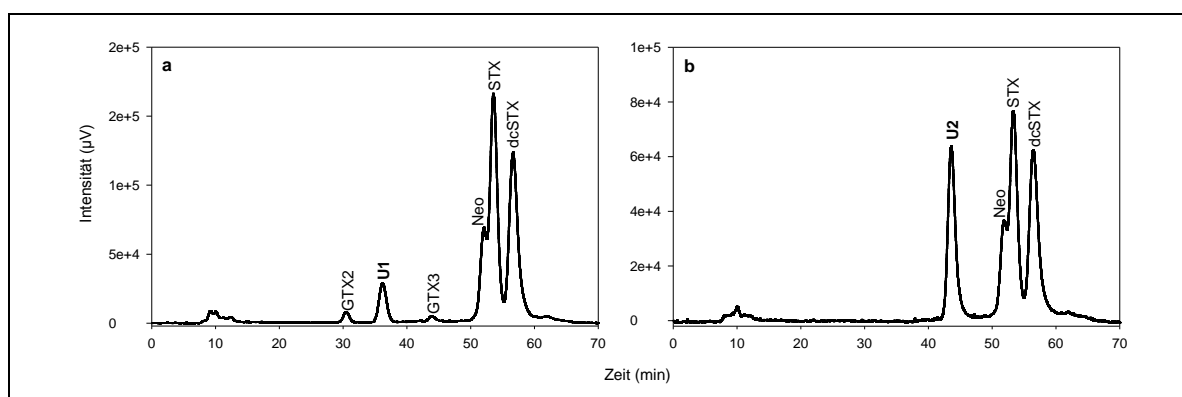
##### **4.2.5.2 Ermittlung der Retentionszeiten**

Zur quantitativen Bestimmung von PSP-Toxinen mittels HPLC-FLD-Methoden erfolgt eine Nachsäulenderivatisierung, um die nicht fluoreszierenden PSP-Toxine in fluoreszenz-aktive Derivate umzuwandeln. Folglich dürfen zur Isolation von reinen PSP-Toxinen die Nachsäulenderivatisierungseinheit sowie der Fluoreszenzdetektor nicht betrieben und die Fraktionssammlung muss „blind“, d.h. direkt nach Austritt der mobilen Phase aus der Säule durchgeführt werden, wodurch es zu einer Verkürzung der mittels Fluoreszenzdetektion ermittelten Retentionszeiten kommt.

Zur Ermittlung dieser Retentionszeitverschiebungen erfolgten Bestimmungen der Retentionszeiten eines Standards von GTX2 ( $t_R = 29,0$  min) und GTX3 ( $t_R = 44,8$  min) nach einer Trennung mittels ZIC-HILIC-Säule. Anschließend wurde eine mehrfache Fraktionierung zwischen 22 und 45 min im Minutentakt gefolgt von der Überprüfung der erhaltenen Fraktionen mittels Ionenpaarchromatographie durchgeführt. Es ergab sich eine Verschiebung der Retentionszeiten von GTX2 und GTX3 ohne Nachsäulenderivatisierung um 3 bis 4 min hin zu kürzeren Retentionszeiten.

#### 4.2.5.3 Durchführung der semipräparativen HPLC

Mittels HILIC-FLD-Analytik konnte im Essigsäureextrakt der gefriergetrockneten Biomasse des Strains ITEP-018 aus dem Jahr 2006 neben den PSP-Toxinen GTX2, GTX3, Neo, STX und dcSTX auch ein unbekannter Peak bei  $t_R = 37,0 \pm 0,5$  min identifiziert werden, der im weiteren Verlauf als U1 bezeichnet wurde. Allerdings ergab die Analyse des Essigsäureextraktes nach saurer Hydrolyse die Abwesenheit von U1, jedoch konnte dafür ein neuer unbekannter Peak (U2) bei  $t_R = 44,0 \pm 0,5$  min detektiert werden (Abb. 21). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass es sich bei dem unbekannten Peak U1 tatsächlich um ein PSP-Toxin handelt, wahrscheinlich um ein N-Sulfocarbamoyltoxin, welches nach saurer Hydrolyse in das entsprechende Carbamoyltoxin U2 transformiert wird, denn unter gleichen Hydrolysebedingungen werden die N-Sulfocarbamoyltoxine B1, B2, C1, C2, C3 und C4 in STX, Neo, GTX2, GTX3, GTX1 und GTX4 umgewandelt.



**Abb. 21:** HILIC-FLD-Chromatogramme des essigsauren Extraktes von ITEP-018 vor (a) und nach saurer Hydrolyse (b)

Zur Überprüfung, ob es sich bei den Peaks von U1 und U2 tatsächlich um PSP-Toxine handeln kann, wurden Analysen der Essigsäureextrakte sowie sauer hydrolysierter Extrakte ohne Nachsäulenderivatisierung, jedoch mit Fluoreszenzdetektion, durchgeführt.

Es konnten keine Peaks detektiert werden, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei U1 und U2 um natürlich fluoreszierende Substanzen handelt.

Zur Isolation von U1 bzw. U2 wurden jeweils zwischen 30 und 50  $\mu\text{L}$  der Essigsäure-extrakte bzw. der sauer hydrolysierten Extrakte injiziert. Da sich bei der Analytik stets leichte Retentionszeitverschiebungen zeigten, wurde vor jedem Fraktionssammlungstag eine Überprüfung der Retentionszeiten mithilfe der Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion durchgeführt, um die zu fraktionierenden Bereiche exakt festzulegen. Die eigentliche Fraktionssammlung erfolgte durch Sammlung der mobilen Phase unmittelbar nach Austritt aus der ZIC-HILIC-Säule.

Aus den gesammelten Fraktionen wurde unter Stickstoffzufuhr das Acetonitril, der organische Lösungsmittelanteil der mobilen Phase, entfernt. Vom Rückstand wurden jeweils 60  $\mu\text{L}$  zur Überprüfung der Reinheit mittels HILIC-FLD bzw. Ionenpaarchromatographie entnommen (Abb. 22). Bei erfolgreicher Isolation von U1 bzw. U2 fand die Zusammenführung mehrerer Fraktionen statt, welche bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend gefriergetrocknet wurden. Die Resuspension der Lyophilisate erfolgte je nach Anzahl der Fraktionen in 150 bis 500  $\mu\text{L}$  0,03 M Essigsäure (Anhang Tab. 39 und 40).

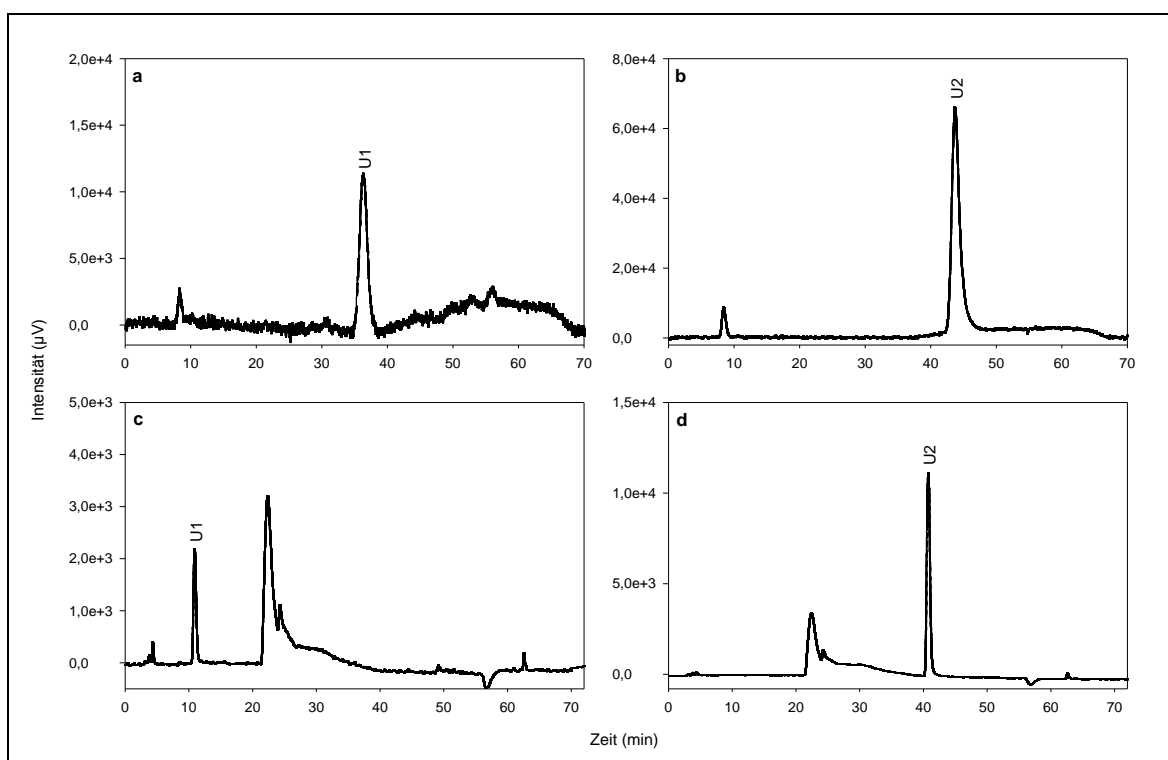


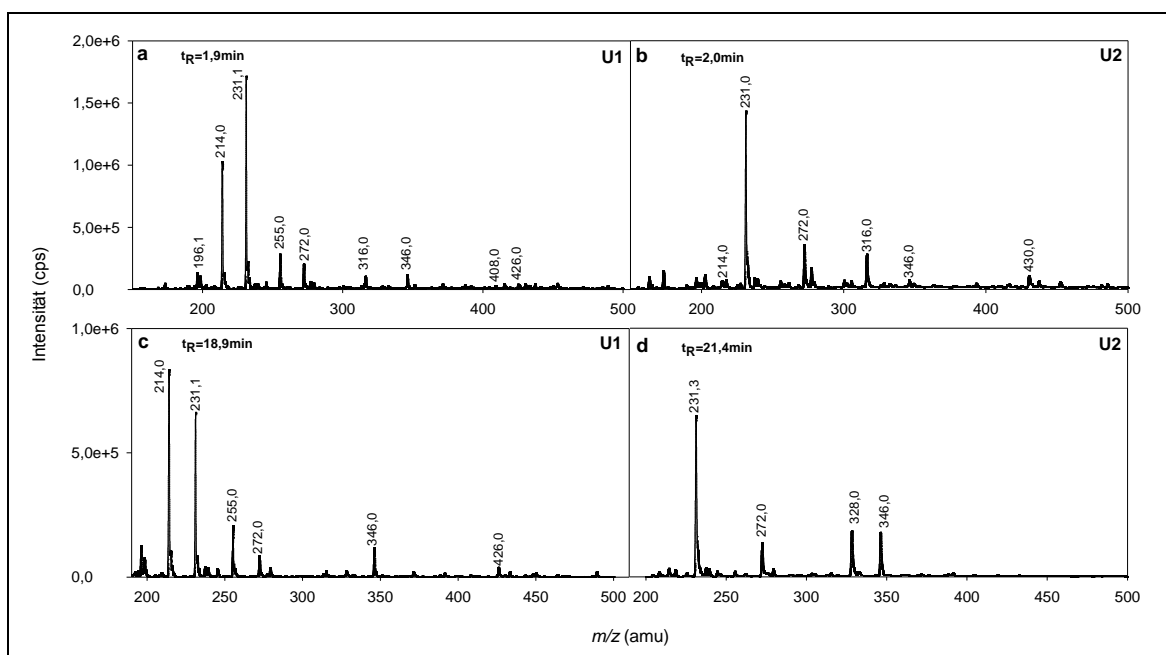
Abb. 22: Überprüfung der U1- bzw. U2- Fraktionen mittels HILIC-FLD (a und b) und mittels Ionenpaarchromatographie (c und d)

#### 4.2.6 Experimente zur Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie

##### 4.2.6.1 Analyse mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie

Erste Untersuchungen wurden an einem LC-MS/MS-System bestehend aus einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu in Kombination mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 365 (AB Sciex) durchgeführt. Die Methode basierend auf der chromatographischen Trennung mittels ZIC-HILIC einschließlich der Eluentenzusammensetzung, des binären Gradientenprogrammes und der MS-Parameter wird unter 4.4 ausführlich erläutert.

Zunächst wurden Scans der Fraktionen mit reinem U1 bzw. U2 ohne Säule, d.h. nach direkter Injektion in das Massenspektrometer durchgeführt, um einen Überblick über die in den Fraktionen vorhandenen Massen zu erhalten. Anschließend erfolgten Scans im Bereich zwischen 200 und 500 amu nach chromatographischer Trennung zur Bestimmung der Retentionszeiten von U1 und U2 und der entsprechenden  $m/z$  (Abb. 23).



**Abb. 23:** Scans reiner Fraktionen von U1 und U2 nach Direktinjektion (a und b; Scanbereich  $m/z$  200-500 amu) und nach chromatographischer Trennung (c und d; Scanbereich  $m/z$  150-500 amu)

Die Scans ließen vermuten, dass U1 bei  $t_R = 18,9 \text{ min}$  durch  $m/z$  346 und 426 sowie U2 bei  $t_R = 21,4 \text{ min}$  durch  $m/z$  328 und 346 charakterisiert werden, denn  $m/z$  214, 255 und 272 wurden auch nach Injektion eines Blindwertes bestehend aus 0,03 M Essigsäure erhalten und sind somit nicht spezifisch für U1 und U2.

Im Anschluss daran wurden Produkt- und Precursorionenscans durchgeführt (Abb. 24). Bei U1 konnte im Produktionenscan von  $m/z$  346 ein Fragment mit  $m/z$  328 detektiert werden, welches auch bei  $m/z$  426 nachweisbar war, jedoch zeigte hier das Fragment  $m/z$  346 die höchste Intensität. Außerdem wiesen die Ergebnisse der Precursorionenscans bei  $m/z$  328 auf 346 und 426 als korrespondierende Precursorionen hin, während bei  $m/z$  328 vorrangig  $m/z$  426 als Elternfragment identifiziert wurde. Die Untersuchungen bzgl. U2 ergaben vergleichbare Ergebnisse, jedoch konnte  $m/z$  426 nicht detektiert werden.

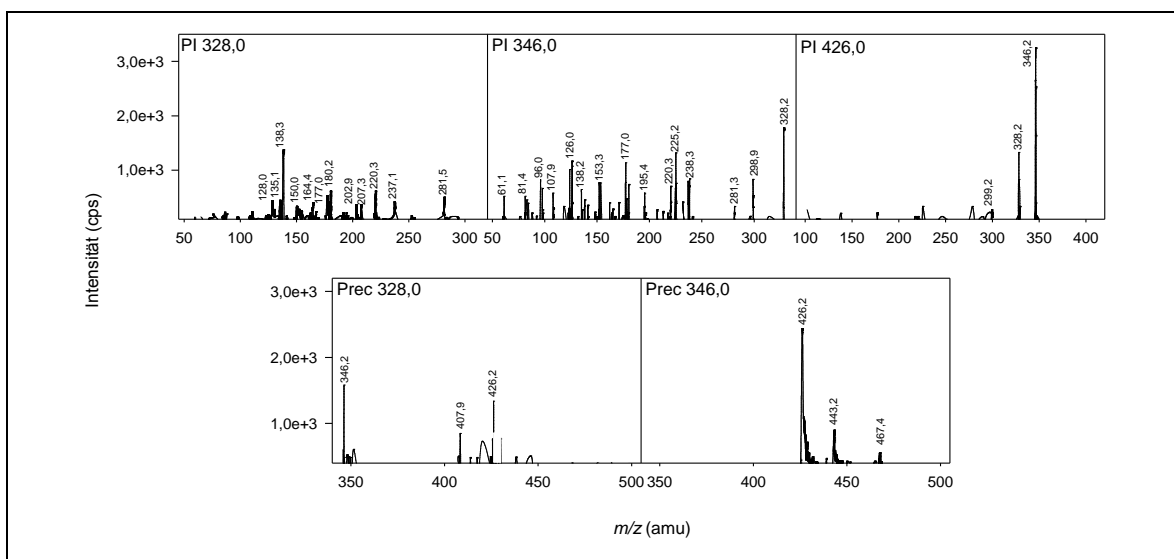


Abb. 24: Produkt- (PI) und Precursorionenscans (Prec) reiner Fraktionen von U1

Anhand der aus den Produkt- und Precursorionenanalysen ableitbaren MRM-Übergänge für U1 ( $m/z$  426 >  $m/z$  346,  $m/z$  426 >  $m/z$  328 und  $m/z$  346 >  $m/z$  328) und U2 ( $m/z$  346 >  $m/z$  328) wurde auf der eingesetzten LC-MS/MS-Methode aufbauend eine neue MRM-Methode erstellt, wobei die Einstellungen der Ionenquellenparameter IS, Neb, CUR und Temp beibehalten wurden. Lediglich die Substanzparameter der einzelnen Übergänge wurden optimiert (Tab. 6).

Tab. 6: MS-Parameter der Analytik mittels Triple-Quadrupol-LC-MS/MS

MRM-Übergang $m/z > m/z$	IS (V)	NEB (L h <sup>-1</sup> )	CUR (L h <sup>-1</sup> )	Temp (°C)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
426,0 > 346,0					26	240	5	15	18
426,0 > 328,0	4000	11	11	450	15	240	5	30	15
346,0 > 328,0					10	240	10	30	15



Abb. 25 zeigt Chromatogramme von U1 und U2 nach Analyse im MRM-Modus. Die Retentionszeiten betrugen  $t_R = 19,0$  min für U1 und  $t_R = 21,3$  min für U2. Im MRM-Chromatogramm von U2 konnte ein schwacher Übergang  $m/z$  426 >  $m/z$  346 detektiert werden.

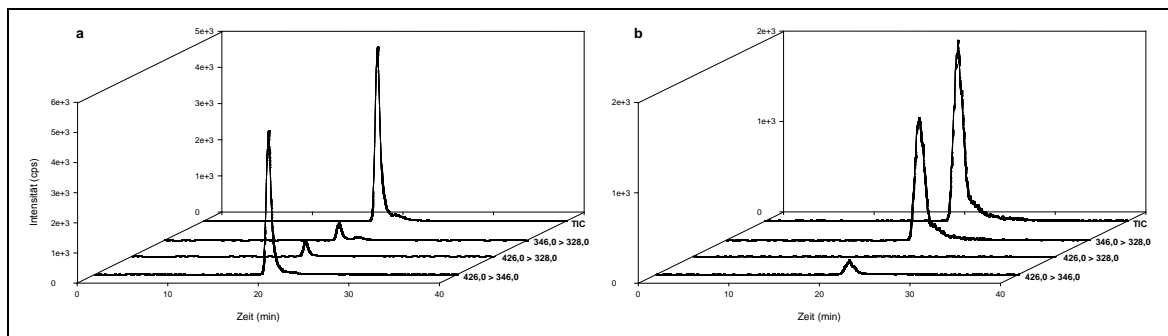


Abb. 25: LC-MS/MS-Chromatogramme (MRM-Modus) von U1 (a) und U2 (b)

Die Fragmentierungsuntersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass aus dem aus den Essigsäureextrakten isolierten U1 mit  $m/z$  426 ( $[M+H]^+$ ) durch Abspaltung einer Sulfatgruppe  $m/z$  346 ( $[M+H-SO_3]^+$ ) entsteht, welches durch den Verlust von Wasser das Fragment  $m/z$  328 ( $[M+H-SO_3-H_2O]^+$ ) bildet. Aufgrund der durch saure Hydrolyse bedingten Abspaltung der Sulfatgruppe wird U1 in U2 umgewandelt und somit vorwiegend der Übergang  $m/z$  426 >  $m/z$  328 detektiert. Allerdings war auch ein schwacher Übergang  $m/z$  426 >  $m/z$  346 im MRM nachweisbar.

Im Anschluss an die Untersuchungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie wurden weitergehende Analysen an MS-Systemen mit einer höheren Sensitivität und Auflösung durchgeführt.

#### 4.2.6.2 Analyse mittels Q Trap-Massenspektrometrie

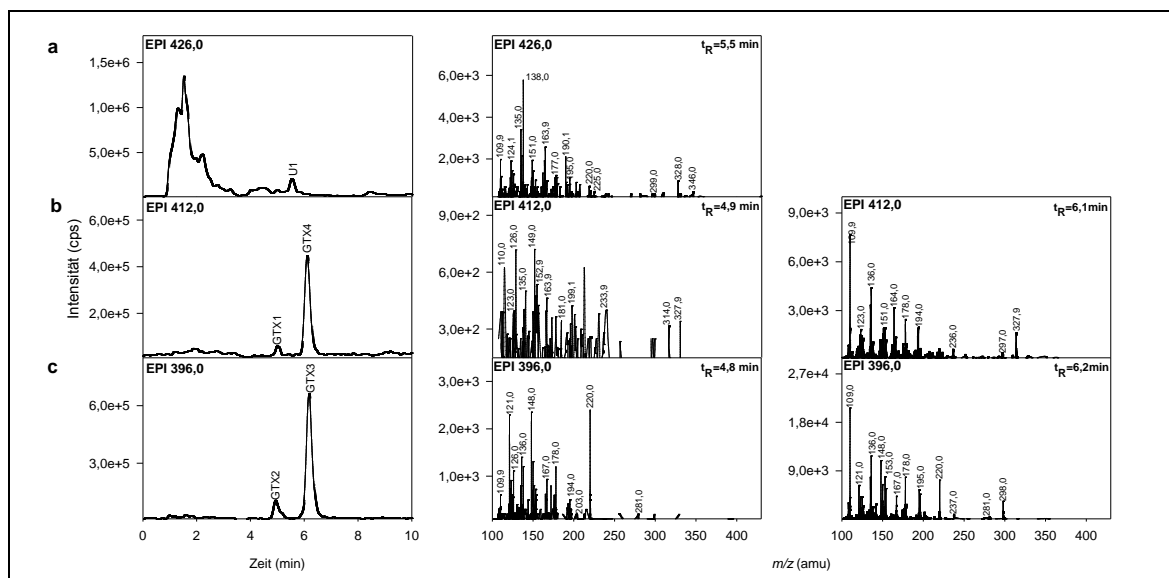
Die Analysen mittels Q Trap-Massenspektrometrie erfolgten an einer HPLC-Anlage bestehend aus Komponenten der Serie 1100 (Agilent), gekoppelt an ein 4000 Q Trap-Massenspektrometer (AB Sciex). Zur chromatographischen Trennung wurde eine ZIC-HILIC-Säule (5  $\mu$ m, 100 Å, 150 x 2,1 mm) unter Verwendung zweier Eluenten eingesetzt, wobei Eluent A 5 mM Ammoniumformiat und 2 mM Ameisensäure in Acetonitril/Wasser (80/20; v/v) und Eluent B 10 mM Ammoniumformiat und 10 mM Ameisensäure in 100 % Wasser enthielt. Es erfolgte eine Gradientenelution mit einem Fluss von 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Die Gradientenelution begann mit einem linearen Abfall von 80 auf 50 % A innerhalb einer Minute, isokratischer Elution bei 50 % A für 9 min, Rückkehr zu den Ausgangsbedingungen von 80 % A innerhalb einer min und einer anschließenden 20 minütigen

Equibrierung der Säule. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im EPI- sowie im MRM-Modus nach positiver Ionisierung anhand der unter 4.2.6.1 ermittelten Massenübergänge. Die MS-Parameter des Q Tap-LC-MS/MS-Systems unterschieden sich leicht von denen des Triple-Quadrupol-LC-MS/MS-Systems (Tab. 7).

**Tab. 7: MS-Parameter der Analytik mittels Q Trap-LC-MS/MS**

MS-Parameter	LC-MS
IS (V)	5000
CUR (L h <sup>-1</sup> )	30
Temp (°C)	650
Ion Source Gas 1 (L h <sup>-1</sup> )	70
Ion Source Gas 2 (L h <sup>-1</sup> )	70
Interface Heater	on
DP (V)	66
CE (V)	variiert
CES (V)	variiert

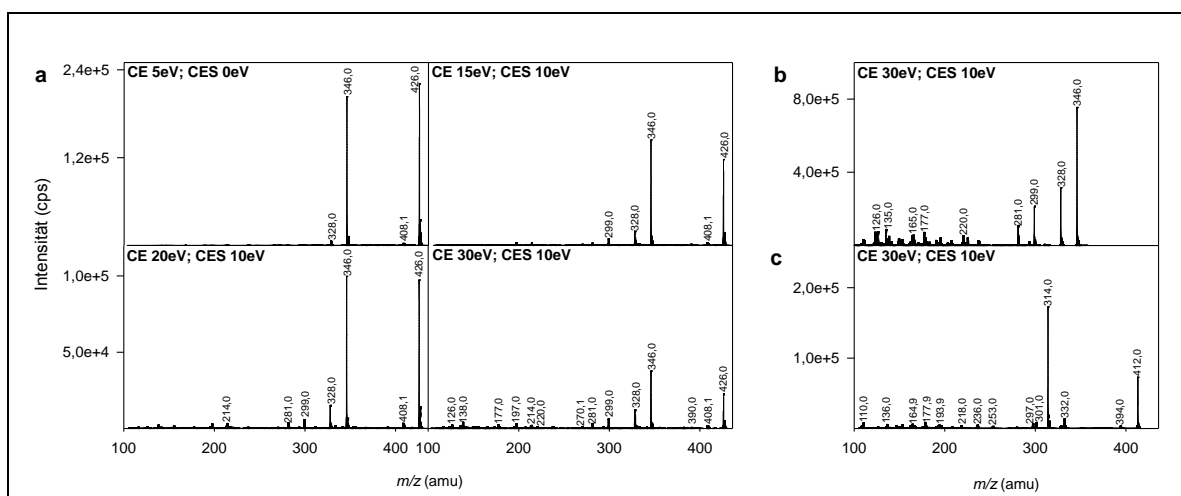
Für erste Untersuchungen wurden 0,03 M Essigsäureextrakte und die hydrolysierten Extrakten von ITEP-018 sowie die PSP-Toxinstandards GTX1/4 und GTX2/3 zum Vergleich des jeweiligen Fragmentierungsspektrums eingesetzt. In Abb. 26 sind die EPI-Scans eines Essigsäureextraktes sowie der PSP-Toxinstandards bei CE 50 eV und CES 0 eV dargestellt.



**Abb. 26: EPI-Scans von U1 extrahiert mit Essigsäure von ITEP-018 (a) sowie von den PSP-Toxinen GTX1/4 (b) und GTX2/3 (c)**

Die Kollisionsenergie CE hat einen großen Einfluss auf die Fragmentierung und somit auf die Intensitäten der Produktionen. Bei Betrachtung von U1 im Essigsäureextrakt fragmentierte das Precursorion  $m/z$  426 sehr stark, sodass die Intensitäten der bereits bekannten Produktionen  $m/z$  346 und  $m/z$  328 sehr gering, die Bereiche zwischen  $m/z$  100 und 200 jedoch stark ausgeprägt waren. Vergleichbare Fragmentierungsergebnisse zeigten sich auch bei GTX1/4 und GTX2/3. So konnten im EPI von GTX1 und GTX4 beispielsweise die charakteristischen Produktionen  $m/z$  395, 332 und 314 nicht bzw. nur schlecht erfasst werden.

Eine Variation von CE ergab bei 30 eV und einer CES von 10 eV ein optimales Fragmentierungsspektrum von U1. Neben  $m/z$  426 konnten im EPI-Scan bei  $t_R = 5,5$  min auch  $m/z$  346, 328, 299 und weitere  $m/z$  mit geringeren Intensitäten detektiert werden. Die Analyse von U2 ( $t_R = 6,2$  min) und GTX4 ( $t_R = 6,1$  min) bei gleichen Bedingungen zeigte ebenfalls hohe Intensitäten der spezifischen Produktionen. In EPI-Spektrum von U2 konnte kein  $m/z$  426 detektiert werden (Abb. 27).



**Abb. 27:** EPI-Scans von U1 extrahiert mit Essigsäure von ITEP-018 bei CE 5 eV, CES 0 eV; CE 10 eV, CES 10 eV; CE 20 eV, CES 10 eV und CE 30 eV, CES 10 eV (a) sowie von U2 nach saurer Hydrolyse des Extraktes (b) und GTX4 (c) bei CE 30 eV, CES 10 eV

Sowohl im EPI-Scan von U1 als auch von U2 wurde das Fragment  $m/z$  299 mit der dritthöchsten Intensität gebildet, gefolgt von  $m/z$  281, was einen Massenverlust von 18 amu durch Wasserabspaltung ergibt. Vergleichbare Fragmentierungen konnten bei GTX4 nicht ermittelt werden, wobei das Fragmentierungsschema von GTX4 sich deutlich von U1 und U2 unterschied (Abb. 28).

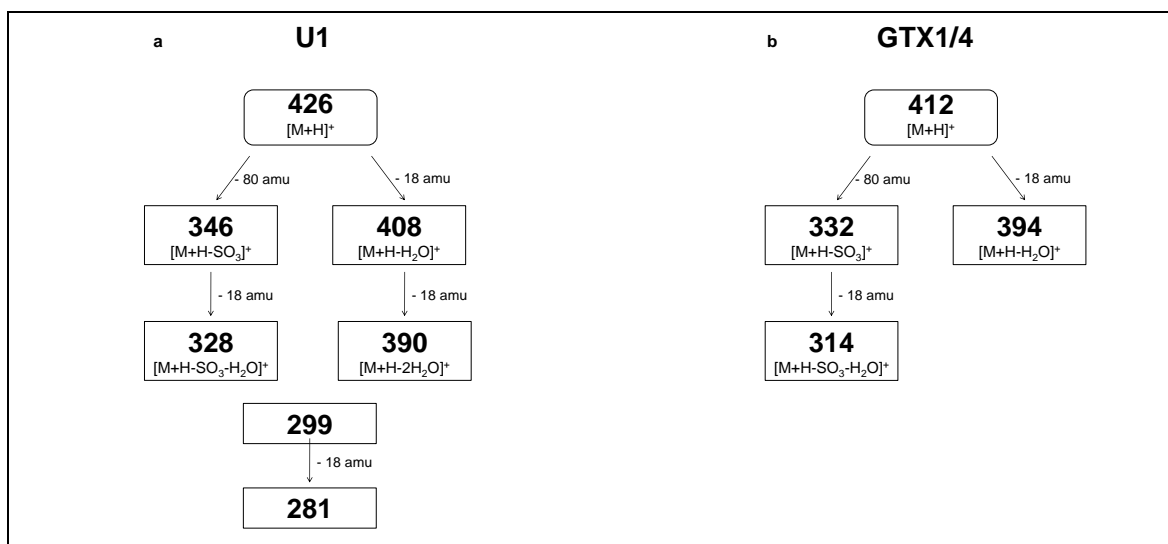


Abb. 28: Fragmentierungsschema von U1 ( $m/z$  426) mit Entstehung von U2 ( $m/z$  346) (a) sowie Fragmentierungsschema von GTX1/4 ( $m/z$  412) (b)

Aufbauend auf den Ergebnissen der EPI-Scans bzgl. des Fragmentierungsmusters von U1 und U2 wurden MRM-Analysen der Übergänge  $m/z$  426 >  $m/z$  346,  $m/z$  426 >  $m/z$  328,  $m/z$  346 >  $m/z$  328 und  $m/z$  346 >  $m/z$  299 mit Essigsäureextrakten von ITEP-018 und weiterer Strains von *Cylindrospermopsis raciborskii* aus Brasilien vor und nach saurer Hydrolyse durchgeführt (Abb. 29).

Im Essigsäureextrakt von ITEP-018 wies der Massenübergang  $m/z$  346 >  $m/z$  328 für U1 bei  $t_R = 5,4$  min die höchste Intensität auf, gefolgt von  $m/z$  346 >  $m/z$  299 und  $m/z$  426 >  $m/z$  328. Die Untersuchungen von Jucaz, ITEP-A1 und ITEP-028 ergaben ebenfalls einen Peak bei  $t_R = 5,3 \pm 0,1$  min. In den hydrolysierten Essigsäureextrakten von ITEP-018 wurden breite Peaks für U2 bei  $t_R = 6,0$  min für den MRM-Übergang  $m/z$  346 >  $m/z$  328 mit der größten Intensität und für  $m/z$  346 >  $m/z$  299 nachgewiesen. Übergänge ausgehend von  $m/z$  426 konnten im Gegensatz zu den Analysen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie nicht detektiert werden. In den hydrolysierten Extrakten von Jucaz, ITEP-A1 und ITEP-028 wurde ebenfalls U2 bei  $t_R = 6,0 \pm 0,1$  min detektiert.

Die MRM-Analysen zeigten, dass das Vorkommen von U1 und U2 nicht nur auf ITEP-018 begrenzt ist, sondern auch weitere Strains von *Cylindrospermopsis raciborskii* aus Brasilien diese bisher unbekannten PSP-Toxine enthalten. So ergaben die Analysen von ITEP-A1 und PMC 00.01, welche am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven kultiviert wurden, ebenfalls das Vorhandensein von U1 in essigsauren Extrakten bzw. U2 nach deren saurer Hydrolyse.

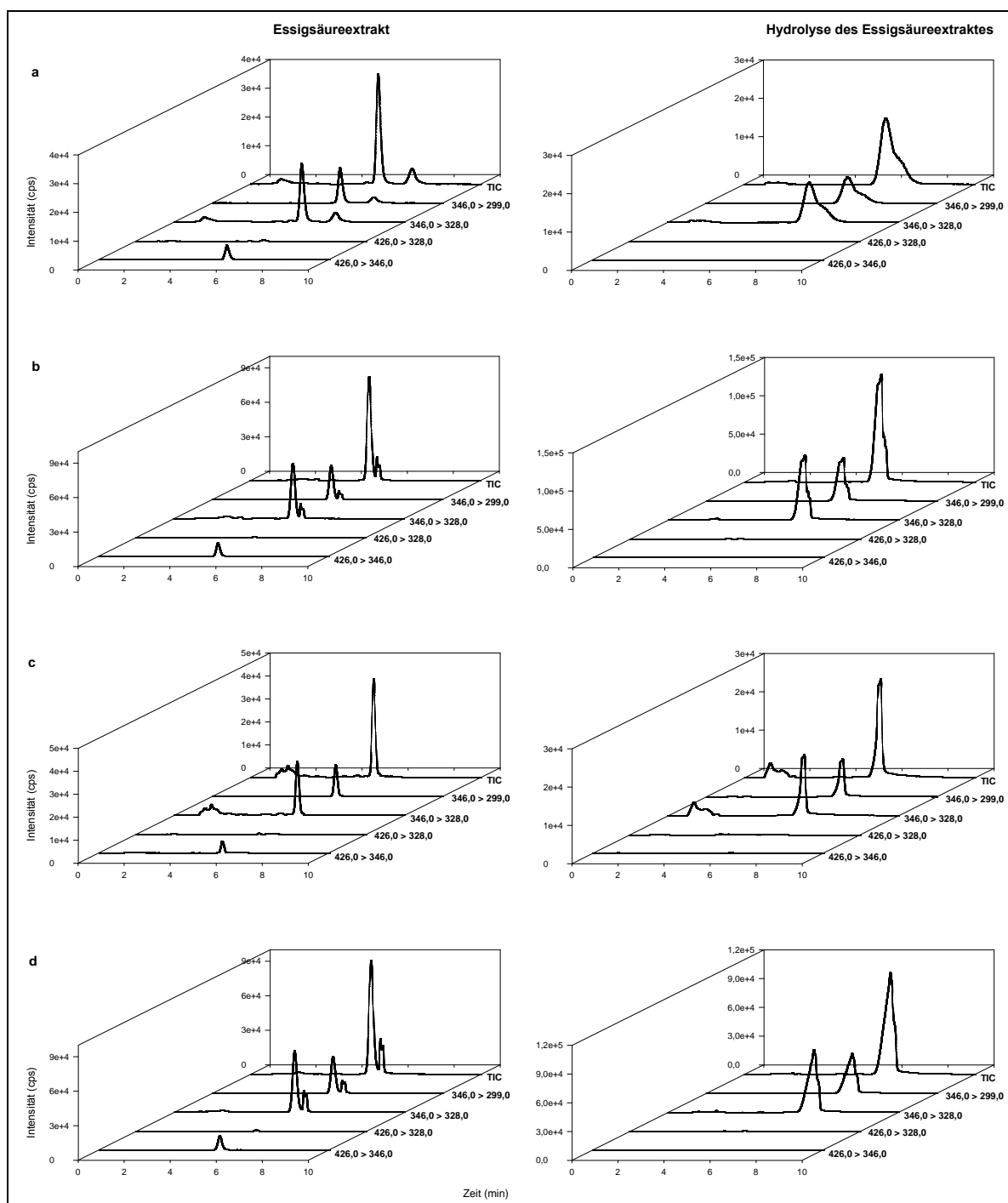


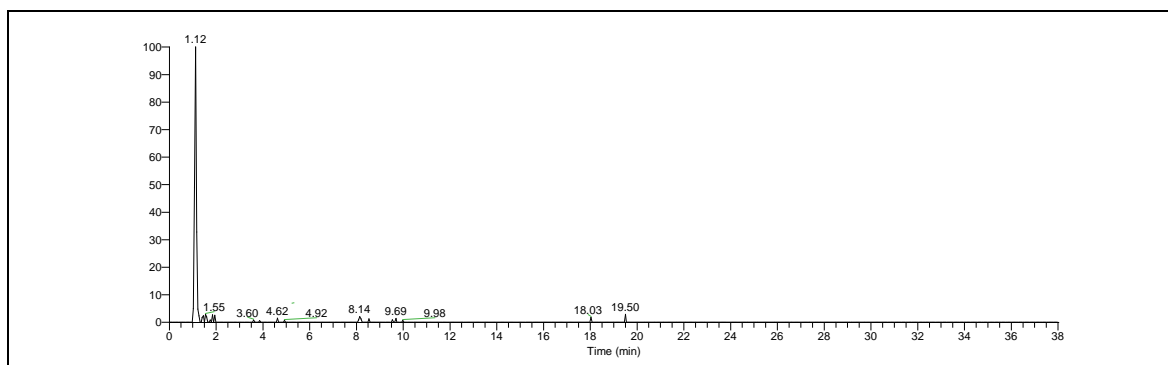
Abb. 29: LC-MS/MS-Chromatogramme (MRM-Modus) der essigsauren Extrakte sowie nach saurer Hydrolyse von ITEP-018 (a), Jucaz (b), ITEP-A1 (c) und ITEP-028 (d)

#### 4.2.6.3 Analysen mittels hochauflösender LC-MS/MS

Zur Analyse der Elementarzusammensetzung von U1 wurden Messungen an einem hochauflösenden Massenspektrometer LTQ Orbitrap FTMS in Kombination mit einer HPLC-Anlage der Firma Dionex durchgeführt. Das LTQ Orbitrap XL FTMS (Thermo Fisher Scientific) ist ein Hybridmassenspektrometer bestehend aus der Kombination einer linearen Ionenfalle und einem Orbitrap-Analysator mit Elektrosprayionisation. Im Massenspektrometer befindet sich eine HCD-Kollisionszelle, welche vielfältige MS/MS-Stoßexperimente und somit den Einsatz zur Strukturaufklärung und Identifikation von Substanzen ermöglicht. Das LTQ Orbitrap FTMS besitzt eine extrem hohe Massengenauigkeit und eine hohe Auflösung.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Symmetry C18 Säule (100 x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Waters GmbH). Die Gradientenelution startete mit einem Anstieg von 5 bis 100 % Methanol in Wasser (v/v) innerhalb von 15 min und verlief isokratisch für 13 min bei 100 % Methanol und anschließend für 10 min bei 5 % Methanol in 0,1 % iger Ameisensäure (v/v). Der Fluss der mobilen Phase betrug 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Die Detektion mittels LTQ Orbitrap FTMS erfolgte bei einer Auflösung von 30000 FWHM. Es wurden Scans bei einer Fragmentierungsenergie von 35 eV in der HCD-Kollisionszelle durchgeführt und die Fragmente von  $m/z$  426 bei der gleichen Auflösung in der Orbitrap analysiert.

Die Analysen wurden nach Injektion des essigsauren Extraktes von ITEP-018 und somit für U1 durchgeführt. Durch den Einsatz einer C18-Säule konnten keine Wechselwirkungen zwischen U1 und der stationären Phase auftreten. U1 eluierte sehr früh direkt nach dem Totvolumen der Säule bei  $t_R = 1,12$  min, was für Untersuchungen bzgl. der Molekülmasse und der Fragmentierung sowie der Elementarzusammensetzung jedoch unerheblich ist. In Abb. 30 ist die Elution von U1 mit  $m/z$  426 bei 1,12 min dargestellt.



**Abb. 30: Scan im Bereich  $m/z$  200-2000 amu für einen essigsauren Extrakt mit einem charakteristischem  $m/z$  426 amu für U1**

Die exakte Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses von U1 ( $[M+H]^+$ ) ergab einen Wert für  $m/z$  von 426,1037 amu (Abb. 31).

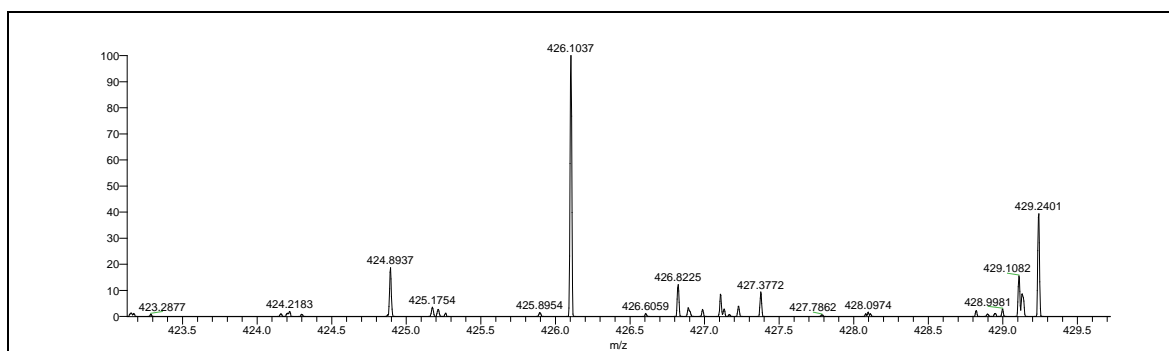


Abb. 31: Bestimmung des Verhältnisses  $m/z$  von U1

Zur Untersuchung der Fragmentierung von  $m/z$  426 wurden Fragmentierungsscans durchgeführt. Es zeigte sich die Bildung der Fragmente  $m/z$  346,1472,  $m/z$  299,3238 und  $m/z$  109,7135. Im Gegensatz zu den bisherigen Analysen konnte kein  $m/z$  328 detektiert werden, was durch Unterschiede bzgl. der Fragmentierungsbedingungen erklärbar ist (Abb. 32). Das Fragment  $m/z$  299 wurde bereits während der Analysen mittels Q Tap-Massenspektrometrie ermittelt.

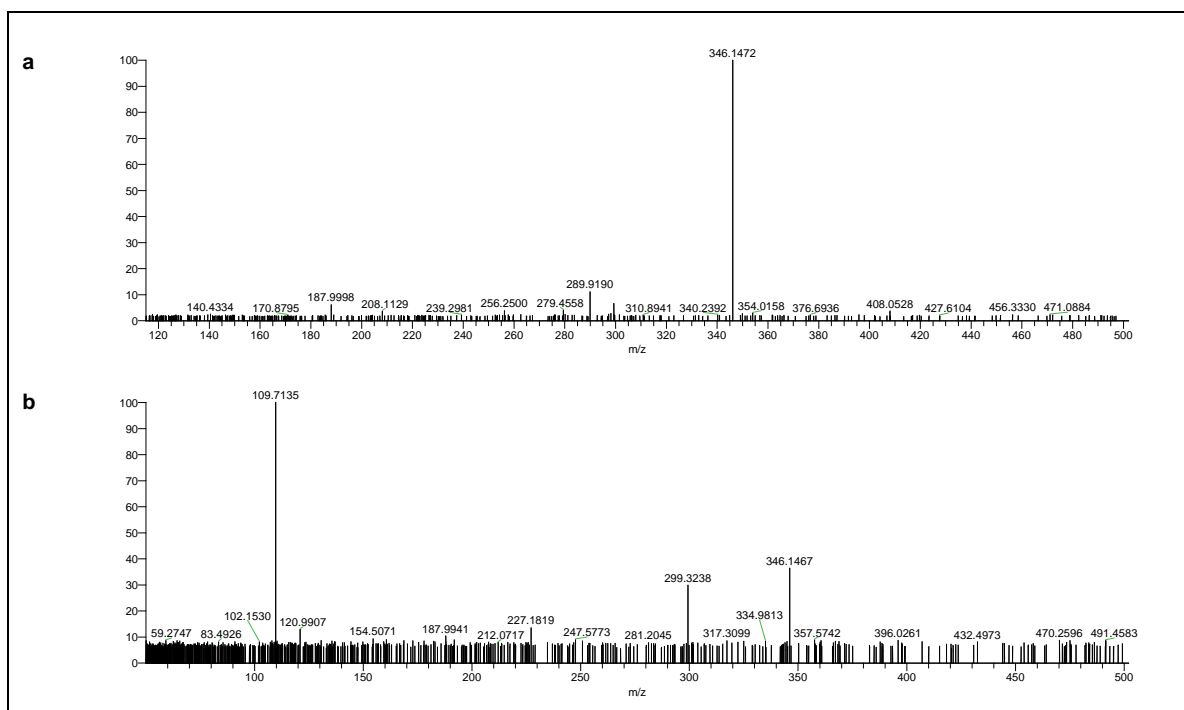


Abb. 32: Fragmentierungsscans von  $m/z$  426 im Bereich  $m/z$  115-500 amu (a) und 50-500 amu (b)

Im Anschluss wurden die Elementarzusammensetzungen bestimmt. Die Summenformeln betrugen für  $m/z$  426,1037  $C_{11}H_{20}N_7O_9S$  und für  $m/z$  346,1472  $C_{11}H_{20}N_7O_6$ . Die Ermittlung der Summenformel von  $m/z$  299,3238 ergab  $C_{20}H_{45}N$ . Allerdings lag bei  $m/z$  299 noch ein Peak darunter, sodass eine Auflösung von 30000 FWHM zur Unterscheidung der überlappenden Peaks wahrscheinlich noch zu gering war.

#### 4.2.7 Diskussion der Ergebnisse

In essigsauren Extrakten des *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains ITEP-018 wurde bei der Analyse mittels hydrophiler Interaktionschromatographie mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion ein unbekannter Peak U1 ( $t_R = 37$  min) detektiert. Nach saurer Hydrolyse des Essigsäureextraktes war U1 nicht mehr nachweisbar, jedoch konnte dafür ein Peak U2 ( $t_R = 44$  min) detektiert werden. Die Tatsache, dass aus U1 und U2 nur mittels der für die PSP-Toxine verwendeten Nachsäulenderivatisierung fluoreszierende Substanzen entstehen, deutete auf eine strukturelle Ähnlichkeit dieser Substanzen mit den PSP-Toxinen hin.

Nach Isolation von U1 und U2 fanden erste Untersuchungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie statt. Für U1 wurde  $m/z$  426 und für U2  $m/z$  346 ermittelt. Aus U1 mit  $m/z$  426 ( $[M+H]^+$ ) entsteht durch Abspaltung einer Sulfatgruppe  $m/z$  346 ( $[M+H-SO_3]^+$ ), welches durch den Verlust von Wasser  $m/z$  328 ( $[M+H-SO_3-H_2O]^+$ ) bildet. U2 entsteht durch saure Hydrolyse aus U1, wobei ebenfalls Sulfat abgespalten wird. Zwar konnten in den U2-Fractionen auch Massenübergänge geringerer Intensität ausgehend von  $m/z$  426 detektiert werden, jedoch widerlegten weitere Untersuchungen mittels Q Trap-Massenspektrometrie das Vorhandensein von  $m/z$  426 nach der Hydrolyse und bestätigten die mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie ermittelten  $m/z$ .

Außerdem wurde eine exaktere Analyse der Fragmentierung von U1 und U2 durchgeführt und dabei konnte neben den Fragmenten  $m/z$  346 und 328 das Fragment  $m/z$  299 im EPI-Spektrum von U1 identifiziert werden, sodass in die MRM-Methode zusätzlich der Massenübergang  $m/z$  346 >  $m/z$  299 integriert wurde.

Ausgehend von  $m/z$  346 stellt  $m/z$  299 einen Verlust von 47 amu bzw. ausgehend von  $m/z$  328 einen Verlust von 29 amu dar. Der Verlust von 47 amu ist durch eine einzelne Abspaltung schwer erklärbar, sodass wahrscheinlich zwei verschiedene Prozesse stattfinden. Zunächst könnte der Verlust von Wasser erfolgen, was zur Bildung von  $m/z$  328 führt. Von diesem Fragment könnte anschließend eine Ethylgruppe ( $CH_3-CH_2-$ )



oder, was wahrscheinlicher erscheint, ein Methylenfragment ( $\text{CH}_3\text{-N-}$ ) abgespalten werden.

Im EPI-Spektrum von U2 wurde im Gegensatz zu den vorherigen Analysen kein  $m/z$  426 detektiert, was ein erneuter Beweis für die Umwandlung von U2 aus U1 durch saure Hydrolyse ist. Außerdem wurden bei der Analyse der hydrolysierten Extrakte im MRM-Modus im Gegensatz zur Analyse mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie trotz einer höheren Sensitivität keine Massenübergänge ausgehend von  $m/z$  426 detektiert.

Anhand der Ergebnisse der EPI-Analysen wurde der Fragmentierungsprozess von U1 dem des bekannten PSP-Toxins GTX4 gegenübergestellt, um durch einen Vergleich der Fragmentierungsmuster eine strukturelle Ähnlichkeit überprüfen zu können. Der Massenunterschied zwischen GTX4 ( $m/z$  412) und U1 ( $m/z$  426) beträgt 14 amu, was auf eine zusätzliche Methylgruppe in der Struktur von U1 hinweisen könnte. In diesem Fall wären die Fragmentierungsmuster sehr ähnlich.

Die EPI-Scans zeigten jedoch unterschiedliche Fragmentierungsmuster von U1 und GTX4. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass U1 methyliertes GTX1 bzw. GTX4 mit einer Sulfatgruppe an  $\text{R}_2$  oder  $\text{R}_3$  darstellt. Wahrscheinlicher ist das Vorhandensein einer N-Sulfonylgruppe ähnlich den N-Sulfocarbamoyltoxinen (B1, B2, C1-4), die sowohl bei der Fragmentierung als auch bei saurer Hydrolyse Sulfat abspalten, erkennbar am Verlust von 80 amu. Während des Fragmentierungsprozesses wird die im Molekül von GTX1/4 vorhandene Sulfatgruppe zwar ebenfalls abgespalten, jedoch geschieht dies nicht bei saurer Hydrolyse. Bei starker struktureller Ähnlichkeit zwischen U1 und GTX1/4 würde während der sauren Hydrolyse dementsprechend aus U1 kein U2 entstehen.

Die Analysen mittels hochauflösender LC-MS/MS bestätigten  $m/z$  426 als charakteristische Masse für U1. Anhand von Fragmentierungsscans konnten die Bildung der Fragmente  $m/z$  346 und  $m/z$  299 erneut eindeutig nachgewiesen werden. Weiterhin war eine Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der Massen möglich.

Die Summenformel von  $m/z$  426 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$ ) zeigte das im Vergleich zu  $m/z$  346 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_6$ ) zusätzliche Vorhandensein einer Sulfatgruppe im Molekül, wodurch sich die Vermutung, dass  $m/z$  426 durch saure Hydrolyse in  $m/z$  346 umgewandelt wird, bestätigen lässt. Auch weist das Fragment  $m/z$  346 eine Methylgruppe mehr als die PSP-Toxine GTX1/4 mit der Summenformel  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$  auf, was wegen der ansonsten vergleichbaren strukturellen Zusammensetzung als weiterer Beweis dafür gelten kann, dass es sich bei U1 und seinem Hydrolyseprodukt U2 um PSP-Toxine handelt.

Der Nachweis von U1 Essigsäureextrakten bzw. von U2 in diesen nach saurer Hydrolyse konnte bei der Analyse von neuem Probenmaterial nicht bestätigt werden, da die aktuell kultivierten Strains von ITEP-018 im Gegensatz zum Strain aus dem Jahr 2006 keine PSP-Toxinproduktion mehr aufweisen. Weitere Analysen ergaben jedoch, dass auch verschiedene andere Strains von *Cylindrospermopsis raciborskii* U1 bilden, sodass dessen Vorkommen nicht auf ITEP-018 beschränkt ist.

Für eine exakte Bestimmung der Strukturen von U1 mit  $m/z$  426 und U2 mit  $m/z$  346 sind weitere Untersuchungen notwendig. Am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven erfolgt gegenwärtig die Kultivierung des Strains ITEP-A1. Nach Gewinnung ausreichender Biomasse soll die Isolation der unbekannten PSP-Toxine mit anschließenden Strukturaufklärungen mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden.

Molica et al. berichteten im Jahr 2002 über ein bis dahin unbekanntes PSP-Toxin im Strain ITEP-018 aus dem Tabocas Reservoir in Caruaru, Brasilien [155]. Die HPLC-FLD-Analysen nach Oshima und Lagos [156] zeigten neben STX, dcSTX, Neo und B2 das Vorhandensein eines unbekannten PSP-Toxins an. LC-MS-Analysen wurden jedoch lediglich bzgl. der bekannten PSP-Toxine durchgeführt, sodass eine Aussage darüber, ob das von Molica et al. entdeckte PSP-Toxin mit U1 übereinstimmt, zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich ist.

### **4.3 Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs in Kugelfischen unterschiedlicher Herkunft**

#### **4.3.1 Einleitung**

Eine Vielzahl von Untersuchungen in der Vergangenheit zeigte, dass die sich in ihrer Toxizität und Wirkungsweise kaum unterscheidenden PSP-Toxine und TTXs in gleichen Organismen, z.B. einigen Kugelfischarten, nachweisbar sind.

Der Einsatz verschiedener, auf hydrophiler Interaktionschromatographie basierender Analysemethoden sollte die eindeutige Identifizierung und quantitative Bestimmung von PSP-Toxinen bzw. TTXs in Kugelfischen unterschiedlicher Herkunft ermöglichen.

#### **4.3.2 Standardsubstanzen**

Zur Identifikation und Quantifizierung der PSP-Toxine wurden Standards für GTX1-4, dcGTX2/3, B1, C1/2, Neo, dcSTX und STX eingesetzt. Der zur Bestimmung von TTX verwendete Standard enthielt in geringen Konzentrationen AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX, sodass deren Quantifizierung unter Berücksichtigung der unterschiedlichen molaren Massen und der errechneten Konzentrationen im Standard analog zur Kalibration von TTX erfolgte.

#### **4.3.3 Probenmaterial**

Zur Analyse von PSP-Toxinen und TTXs standen Kugelfischproben unterschiedlicher Herkunft zur Verfügung, u.a. verschiedene Gewebe der marinen Spezies *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia sowie Proben mariner Kugelfische aus Phan Thiet in der Provinz Binh Thuan und aus Vung Tau in der Provinz Ba Ria-Vung Tau aus Vietnam. Außerdem wurden Kugelfische aus Japan analysiert. Hierfür waren Proben der Haut von *Takifugu poecilonotus* aus der Bucht von Osaka und verschiedene Gewebe einer unbekannten Spezies aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama verfügbar.

#### **4.3.4 Extraktion des Probenmaterials**

2-10 g des homogenisierten Probenmaterials wurden mit 3 - 20 mL 0,03 M Essigsäure extrahiert und mittels Ultraschallstab für 1 min sowie anschließend mittels Ultraschallbad für 15 min aufgeschlossen. Nach Zentrifugation der Extrakte bei 14000 rpm für 15 min wurde der Überstand durch 0,45 µm Nylon-Spritzenfilter filtriert und in HPLC-Vials überführt.

Durch Verwendung von 0,03 M Essigsäure als Extraktionsmittel wird die Extraktion sowohl von PSP-Toxinen als auch von TTXs ermöglicht. Die Ausbeute beider Toxingruppen nach einmaliger Extraktion lag bei früheren Untersuchungen bei über 85 % [157].

#### **4.3.5 Nachweis von TTXs mittels LC-MS und LC-MS/MS**

##### **4.3.5.1 Das LC-MS- und LC-MS/MS-System**

Der Nachweis von TTXs mittels LC-MS und LC-MS/MS erfolgte in Anlehnung an von Diener et al. (2007) veröffentlichten Methoden [140, 146]. Zur Detektion von TTXs mittels LC-MS wurde ein Single-Quadrupol-Massenspektrometer API 165 (AB Sciex) in Kombination mit einer HPLC-Anlage der Firma Agilent und zur Bestimmung mittels LC-MS/MS ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 365 (AB Sciex) in Verbindung mit einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu eingesetzt.

##### **4.3.5.2 HPLC-Bedingungen**

Die chromatographische Trennung der TTXs fand an einer ZIC-HILIC Säule (5 µm, 100 Å, 150 x 2,1 mm) bei Verwendung einer binären mobilen Phase mit Gradientenelution bei einem Fluss von 0,25 mL min<sup>-1</sup> statt (Tab. 8). Sowohl für die Analytik mittels LC-MS als auch mittels LC-MS/MS enthielt Eluent A 10 mM Ammoniumformiat und 10 mM Ameisensäure in Wasser (v/v), während sich Eluent B aus 5 mM Ammoniumformiat und 2 mM Ameisensäure in 80 % Acetonitril / 20 % Wasser (v/v) zusammensetzte.

**Tab. 8: Gradientenprogramm für die LC-MS- und LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs**

LC-MS			LC-MS/MS		
Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	0	100	0	5	95
7	45	55	0,1	35	65
10	65	35	7	35	65
18	65	35	10	5	95
18,1	0	100	30	5	95
27	0	100			

#### 4.3.5.3 MS- und MS/MS-Bedingungen

Die massenspektrometrische Detektion mittels LC-MS erfolgte im SIM-Modus nach positiver Ionisierung. Es wurden folgende  $m/z$  analysiert: 320,0 (TTX und epiTTX), 302,0 (AnhydroTTX), 304,0 (11-DeoxyTTX und 5-DeoxyTTX), 272,0 (TrideoxyTTX), 306,0 (norTTX-6,6-diol) und 290,0 (norTTX-6-ol).

Bei der Analyse von TTXs mittels LC-MS/MS fand die Detektion nach positiver Ionisierung im MRM-Modus statt. Neben den MRM-Übergängen von TTX und epiTTX ( $m/z$  320,0 >  $m/z$  162,0), AnhydroTTX ( $m/z$  302,0 >  $m/z$  162,0), 11-DeoxyTTX und 5-DeoxyTTX ( $m/z$  304,0 >  $m/z$  164,0) umfasste die Methode zusätzlich folgende Übergänge:  $m/z$  272,0 >  $m/z$  162,0 (5,6,11-TrideoxyTTX),  $m/z$  306,0 >  $m/z$  178,0 (norTTX-6,6-diol) und  $m/z$  290,0 >  $m/z$  162,0 (norTTX-6-ol). Die verwendeten MS-Parameter der LC-MS- bzw. der LC-MS/MS-Bestimmung sind in Tab. 9 gegeben.

**Tab. 9: Parameter für die LC-MS- bzw. die LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs**

MS-Parameter	LC-MS	LC-MS/MS
IS (V)	5000	4500
NEB (L h <sup>-1</sup> )	12	12
CUR (L h <sup>-1</sup> )	12	11
Temp (°C)	500	500
DP (eV)	40	40
FP (eV)	200	160
EP (eV)	6	6
CE (eV)	-	50
CEP (eV)	-	15

### 4.3.6 Nachweis von PSP-Toxinen mittels HILIC-FLD

#### 4.3.6.1 Das HPLC-System

Die Bestimmung der PSP-Toxine erfolgte mittels hydrophiler Interaktionschromatographie mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion entsprechend der Methode von Diener et al. [140]. Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Shimadzu, ausgestattet mit einer CRX390 Reaktionseinheit (Pickering Laboratories) und zwei für die Nachsäulenderivatisierung notwendigen Pumpen der Firma Shimadzu eingesetzt.

#### 4.3.6.2 HPLC-Bedingungen

Die chromatographische Trennung der PSP-Toxine wurde mit einer ZIC-HILIC Säule (5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 250 x 4,6 mm) unter Einsatz einer Gradientenelution mit einem binären Eluentengemisch bei einem Fluss von 0,7 mL min<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Eluentenzusammensetzung und das Gradientenprogramm zeigt Tab. 10.

**Tab. 10: Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die HILIC-FD-Bestimmung von PSP-Toxinen**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	10 mM Ammoniumformiat 10 mM Ameisensäure in Wasser (v/v)	8 mM Ammoniumformiat in 80 % Acetonitril / 20 % Wasser (v/v)
0	18	82
24	18	82
30	30	70
35	30	70
35,1	35	65
50	35	65
52	30	70
52,1	18	82
75	18	82

#### 4.3.6.3 Nachsäulenderivatisierung und Detektion

Die Derivatisierung der PSP-Toxine erfolgte bei 50 °C durch Zugabe von 10 mM Periodsäure und 550 mM Ammoniaklösung als Derivatisierungsreagenz mit anschließendem Ansäuern mit 0,75 M Salpetersäure auf einen pH-Wert von 2 bis 3 (jeweils bei einem Fluss von 0,3 mL min<sup>-1</sup>). Die Fluoreszenzdetektion der oxidierten PSP-Toxine erfolgte bei einer Extinktionswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 395 nm.

### 4.3.7 Nachweis von PSP-Toxinen mittels LC-MS

#### 4.3.7.1 Das LC-MS-System

Die massenspektrometrische Detektion der PSP-Toxine wurde mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer API 165 (AB Sciex) in Kombination mit einer HPLC-Anlage der Firma Agilent durchgeführt.

#### 4.3.7.2 HPLC-Bedingungen

Die chromatographische Trennung der PSP-Toxine erfolgte unter Verwendung einer ZIC-HILIC Säule (5 µm, 100 Å, 150 x 2,1 mm) und einer binären mobilen Phase bei einem Fluss von 0,25 mL min<sup>-1</sup> (Tab. 11).

**Tab. 11: Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	8 mM Ammoniumformiat 2 mM Ameisensäure in 10 % Acetonitril / 90 % Wasser (v/v)	8 mM Ammoniumformiat 2 mM Ameisensäure in 80 % Acetonitril / 20 % Wasser (v/v)
0	20	80
3	20	80
5	50	50
7	50	50
8	70	30
10	70	30
12	80	20
21	80	20
26	20	80
33	20	80

#### 4.3.7.3 MS-Bedingungen

Die massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus erfolgte nach positiver Ionisierung. Die verwendeten MS-Parameter sind in Tab. 12 dargestellt.

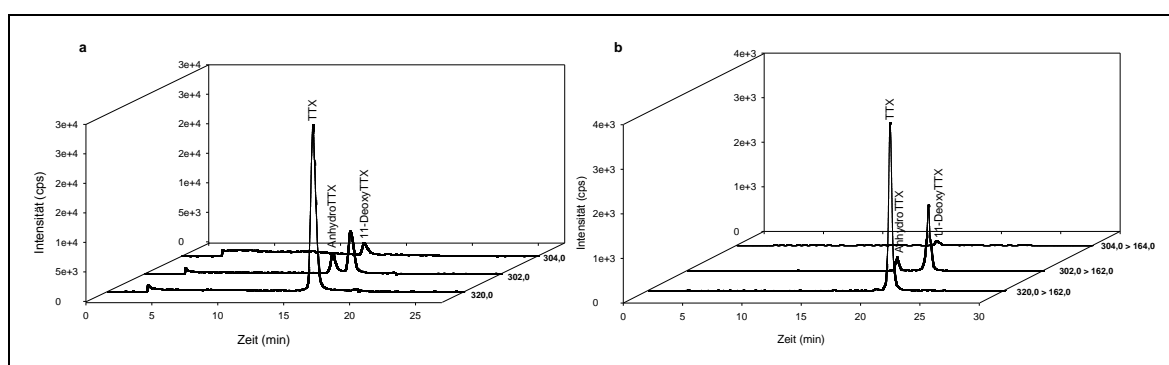
**Tab. 12: MS-Parameter für die Bestimmung von PSP-Toxinen**

	GTX1/4		dcGTX2/3		GTX2/3	GTX2/3 Neo	STX	dcSTX
<i>m/z</i>	412,0	332,1	353,0	273,1	396,0	316,1	300,1	257,1
IS (V)	4200	4200	4200	4200	4200	4200	4200	4200
NEB (L h <sup>-1</sup> )	11	11	11	11	11	11	11	11
CUR (L h <sup>-1</sup> )	9	9	9	9	9	9	9	9
Temp (°C)	350	350	350	350	350	350	350	350
DP (eV)	7	10	6	30	7	25	25	25
FP (eV)	150	175	170	190	150	190	175	175
EP (eV)	5	9	1	5	1	5	7	7

### 4.3.8 Ergebnisse

#### 4.3.8.1 Ergebnisse der Tetrodotoxinanalytik

Zur Quantifizierung der TTXs in den Kugelfischen aus Malaysia und Vietnam wurden Fünfpunktkalibrationen von TTX, AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX durchgeführt. Die Angaben erfolgten in absoluten Konzentrationen auf der ZIC-HILIC-Säule (ng on column). Die Nachweisgrenzen (LOD, limit of detection) in ng on column mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N, signal to noise) von 3 betrugen für die Analytik mittels LC-MS 0,42 ng TTX, 0,40 ng AnhydroTTX und 0,37 ng 11-DeoxyTTX bzw. für die Bestimmung mittels LC-MS/MS 0,14 ng TTX, 0,16 ng AnhydroTTX und 0,12 ng 11-DeoxyTTX. Die LC-MS- und LC-MS/MS-Chromatogramme eines TTX-Standards sind in Abb. 33 dargestellt.



**Abb. 33: LC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus (a) und LC-MS/MS-Chromatogramm im MRM-Modus (b) eines TTX-Standards (10 ng)**

Bei der Analyse verschiedener Gewebe von *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia wurden die höchsten Konzentrationen von TTX in den Gonaden von Probe 2 ermittelt, jedoch enthielt das Muskelgewebe der Proben 2 und 3 vergleichbare Mengen an TTX.



AnhydroTTX konnte nur in geringen Konzentrationen im Magen- und Muskelgewebe von Probe 1 und in den Gonaden der Probe 2 nachgewiesen werden. Lediglich in den Gonaden von Probe 2 lagen die ermittelten Konzentrationen von 11-DeoxyTTX oberhalb des LOD.

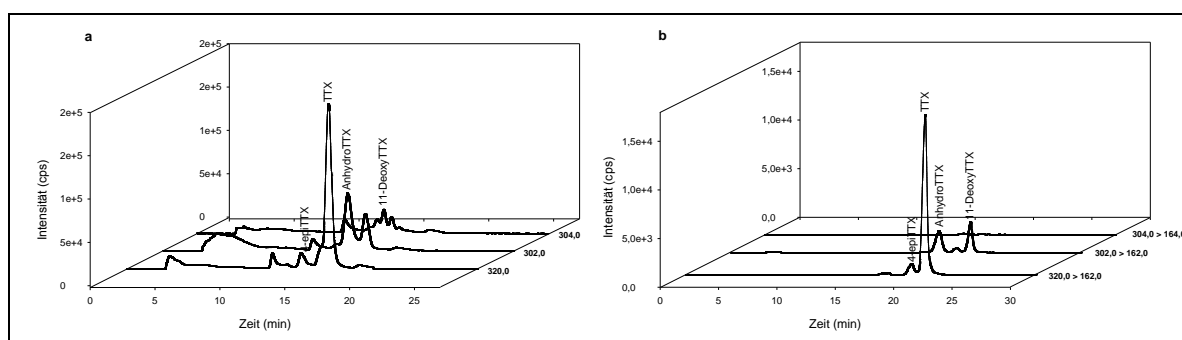
In allen Proben wurde 4-epiTTX detektiert, dessen Quantifizierung anhand der Kalibration von TTX durchgeführt wurde, da 4-epiTTX mit  $m/z$  320,0 identisch zu TTX ist.

Die Gegenüberstellung der mittels LC-MS und LC-MS/MS ermittelten Ergebnisse zeigen vergleichbare Werte (Tab. 13; Anhang Tab. 41 bis 44).

**Tab. 13: Ergebnisse der LC-MS- und LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs in *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia**

Probe	Gewebe	Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) LC-MS				Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) LC-MS/MS			
		TTX	4-epi TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	4-epi TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
1	Magen	0,9	0,14	0,04	0,0	0,7	0,12	0,02	0,0
	Muskel	0,6	0,12	0,03	< LOD	0,5	0,09	0,01	< LOD
2	Muskel	4,3	0,41	0,0	< LOD	3,6	0,31	0,0	< LOD
	Haut	2,2	0,07	0,0	< LOD	2,0	0,05	0,0	< LOD
	Gonaden	5,3	0,46	0,1	0,11	4,5	0,31	0,1	0,03
3	Muskel	5,2	0,53	0,0	< LOD	4,4	0,30	0,0	< LOD
	Magen	0,8	0,25	0,0	< LOD	0,8	0,10	0,0	< LOD

In Abb. 34 sind die Chromatogramme mittels LC-MS- bzw. LC-MS/MS-Bestimmung der Gonaden der Probe 2 gegenübergestellt.



**Abb. 34: LC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus (a) und LC-MS/MS-Chromatogramm im MRM-Modus (b) eines Extraktes von *Lagocephalus wheelerie* (Gonaden) aus Malaysia**

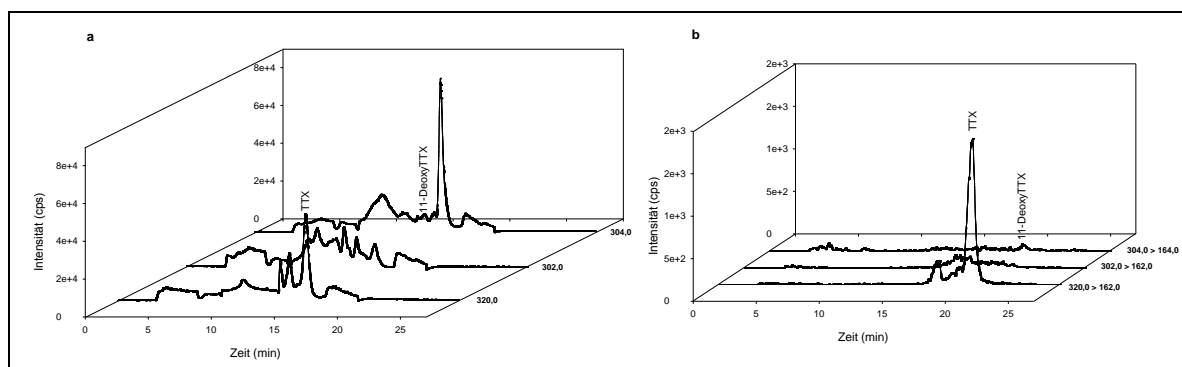
In den marinen Kugelfischproben der unbekannten Spezies aus Phan Thiet und Vung Tau aus Vietnam wurde kein AnhydroTTX detektiert. Während die Proben aus Phan Thiet vorrangig TTX und in kleineren Konzentrationen 11-DeoxyTTX enthielten, wurden in den Proben aus Vung Tau vergleichbare Mengen beider TTXs ermittelt. Die mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS erzielten Ergebnisse sind vergleichbar (Tab 14; Anhang Tab. 43 bis 46).

**Tab. 14: Ergebnisse der LC-MS- und LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Vietnam**

Herkunft	Gewebe	Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) LC-MS			Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) LC-MS/MS		
		TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
Phan Thiet	gesamter Fischkörper	1,6	0,0	0,3	1,2	0,0	0,2
Vung Tau	gesamter Fischkörper	0,3	0,0	0,2	0,5	0,0	0,2

Die Analyse der Proben beider Herkunftsorte mittels LC-MS ergab bei  $m/z$  304,0 neben 11-DeoxyTTX ( $t_R = 13,8$  min) einen weiteren Peak ( $t_R = 14,7$  min) mit einer hohen Intensität. Durch Untersuchungen mittels LC-MS/MS bei dem für 11-DeoxyTTX spezifischen MRM-Übergang  $m/z$  304,0 >  $m/z$  164,0 wurde jedoch nur das Vorhandensein des schon mittels LC-MS identifizierten 11-DeoxyTTX in vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen, sodass ausgeschlossen werden kann, dass der Peak bei  $t_R = 14,7$  min durch eine Retentionszeitverschiebung 11-DeoxyTTX entspricht.

In Abb. 35 sind die Chromatogramme der Bestimmung mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS der Kugelfischproben aus Phan Thiet gegenübergestellt.

**Abb. 35: LC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus (a) und LC-MS/MS-Chromatogramm im MRM-Modus (b) des Extraktes eines Kugelfisches aus Phan Thiet, Vietnam**

Die aus Küsten- und Brackwasserregionen in Japan stammenden Kugelfische waren unterschiedlicher Herkunft. Das Hautgewebe von *Takifugu poecilonotus* aus der Bucht von Osaka wies insgesamt die höchsten Konzentrationen an TTX auf, während auch geringere Mengen von AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX detektiert werden konnten.

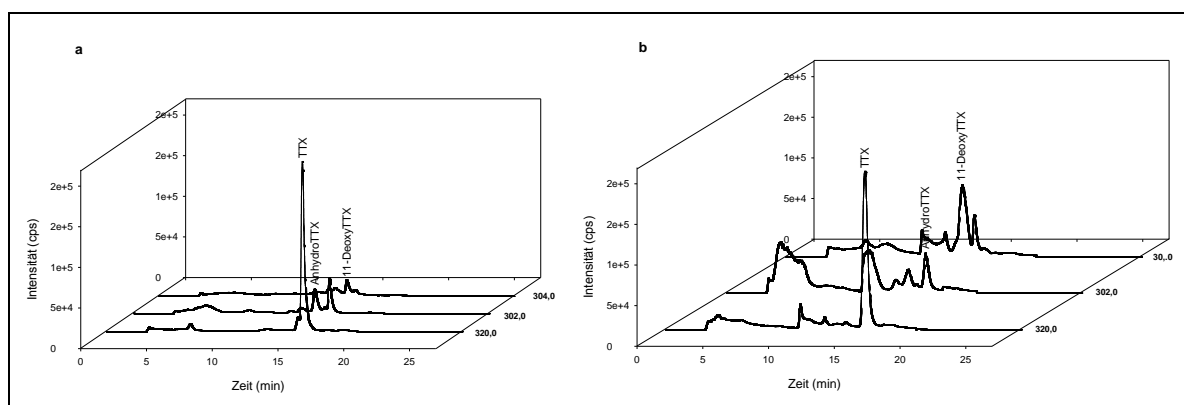
Bei den Kugelfischen aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama standen zwei Proben mit jeweils Haut-, Muskel- und Darmgewebe zu Verfügung. Wie schon bei *Takifugu poecilonotus* zeigte die Haut die höchsten Konzentrationen an TTX, jedoch waren auch AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX teilweise in geringeren Mengen nachweisbar. Die LODs in ng on column bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 betrugen für die

Analytik mittels LC-MS 0,20 ng TTX, 0,17 ng AnhydroTTX und 0,26 ng 11-DeoxyTTX (Tab. 15; Anhang Tab. 47 und 48).

**Tab. 15: Ergebnisse der LC-MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Japan**

Probe	Herkunft	Gewebe	Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
			TTX	AnhydroTTX	11-DeoxyTTX
1	Bucht von Osaka	Haut	3,5	0,6	0,1
2		Haut	2,3	0,4	0,1
3	Küstenregion der Präfektur Wakayama	Haut	1,80	0,2	0,8
		Muskel	0,10	0,0	0,0
		Darm	0,3	0,0	0,0
4		Haut	2,6	0,2	1,4
		Muskel	0,2	0,1	0,1
		Darm	0,3	0,0	0,1

In Abb. 36 sind Chromatogramme der LC-MS-Bestimmung von TTXs der Hautgewebe von *Takifugu poecilonotus* und der unbekannten Kugelfischspezies dargestellt.



**Abb. 36: LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) von Extrakten von *Takifugu poecilonotus* (Haut) aus der Bucht von Osaka (a) und von einem Kugelfisch (Haut) aus der Küstenregion in der Präfektur Wakayama (b)**

#### 4.3.8.2 Ergebnisse der PSP-Toxinanalytik

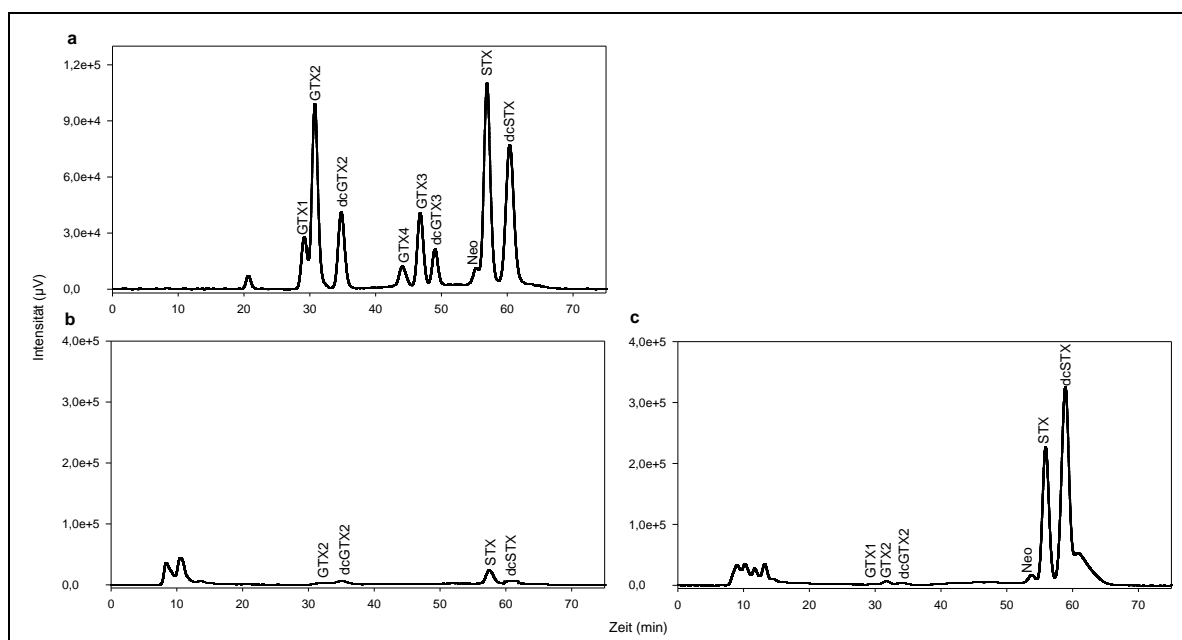
Lediglich in den Kugelfischen aus Japan konnten mittels HILIC-FLD bzw. LC-MS PSP-Toxine nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der mittels HILIC-FLD ermittelten PSP-Toxinkonzentrationen wurden Fünfpunktkalibrationen von GTX1-4, dcGTX2/3, STX, dcSTX, Neo und C1/2 durchgeführt. Die LODs in ng on column bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 lagen zwischen 0,03 und 1,0 ng (Anhang Tab. 50).

Die Analyse der PSP-Toxine mittels HILIC-FLD ergab sowohl in den Hautgewebeprobe von *Takifugu poecilonotus* aus der Bucht von Osaka als auch in den untersuchten Geweben der unbekannten Spezies aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama unterschiedliche Konzentrationen an STX und dcSTX. Weiterhin konnte in einigen Kugelfischproben GTX1, GTX2, dcGTX2 und Neo detektiert werden (Tab. 16; Anhang Tab. 49).

**Tab. 16: Ergebnisse der HILIC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen aus Japan**

Probe	Herkunft	Gewebe	Konzentration (ng g <sup>-1</sup> )					
			GTX1	GTX2	dcGTX2	Neo	STX	dcSTX
1	Bucht von Osaka	Haut	0	94	23	0	37	23
2		Haut	0	83	21	0	32	22
3	Küstenregion der Präfektur Wakayama	Haut	0	0	0	270	81	137
		Muskel	0	0	0	0	16	23
		Darm	0	0	0	0	23	27
4		Haut	146	94	9	463	149	266
		Muskel	0	0	0	0	25	36
		Darm	0	0	0	78	34	37

In Abb. 37 sind die Chromatogramme der PSP-Toxinanalyse der Hautgewebe von *Takifugu poecilonotus* und der unbekannten Kugelfischspezies dargestellt.



**Abb. 37: HILIC-FLD-Chromatogramme eines PSP-Standardmixes (a), eines Extraktes von *Takifugu poecilonotus* (Haut) aus der Bucht von Osaka (b) und von einem Kugelfisch (Haut) aus der Küstenregion in der Präfektur Wakayama (c)**

Zusätzlich zu den HILIC-FLD-Analysen wurden die PSP-Toxine in den Kugelfischen massenspektrometrisch detektiert (Abb. 38).

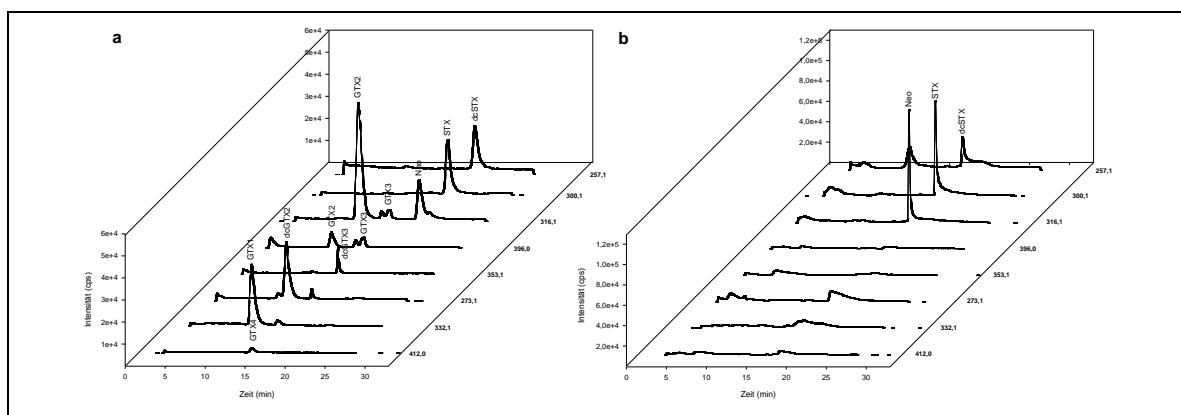


Abb. 38: LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) eines PSP-Standardmixes (a) und eines Kugelfischextraktes (Haut) aus der Küstenregion in der Präfektur Wakayama (b)

#### 4.3.9 Diskussion der Ergebnisse

Die Analytik unterschiedlicher Kugelfische aus Malaysia, Vietnam und Japan bestätigte das Vorhandensein von TTXs in allen zur Untersuchung gelangten Proben. In der marinen Spezies *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia konnte in den Gonaden und im Muskelgewebe vorrangig TTX detektiert werden. Bei den aus Küsten- und Brackwasserregionen stammenden Kugelfischen aus Japan standen Hautgewebe von *Takifugu poecilonotus* sowie verschiedene Gewebe einer unbekannten Spezies zur Verfügung, wobei sowohl im Hautgewebe der unbekannten Spezies als auch im Hautgewebe von *Takifugu poecilonotus* vergleichbare Konzentrationen an TTX detektierbar waren. Im Gegensatz zu *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia enthielt jedoch das Muskelfleisch der unbekannten Spezies aus Japan nur vergleichsweise geringe Konzentrationen an TTX.

In vergangenen Studien wurde belegt, dass Kugelfische aus Küsten- und Brackwasserregionen wie z.B. die untersuchten Spezies aus Japan vorrangig in der Haut die höchsten Konzentrationen an TTXs aufweisen, während in marinen Kugelfischen wie z.B. *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia eine Anreicherung vorwiegend in der Leber und in den Gonaden erfolgt [76-80]. AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX wurden teilweise in geringen Konzentrationen detektiert.

Zur Analyse der Kugelfischproben aus Vietnam standen lediglich Homogenisate der gesamten Fischkörper zur Verfügung, sodass ein Vergleich mit den Gewebeproben aus Malaysia und Japan nicht möglich war. Die Konzentrationen von TTX und 11-DeoxyTTX

waren gering, was durch die Homogenisation verschiedener toxinreicher und toxinarmer Gewebe erklärbar ist. Diese Kugelfische enthielten kein AnhydroTTX.

In allen untersuchten Proben aus Malaysia, Vietnam und Japan konnten außer TTX, 4-epiTTX, AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX keine weiteren TTXs ermittelt werden, wobei die Analysen unterschiedlicher Gewebeproben von Kugelfischen verschiedener Regionen zeigten, dass die Toxizität von Kugelfischen stark variieren kann [75].

Bei Gegenüberstellung der mittels LC-MS und LC-MS/MS ermittelten Ergebnisse ergaben sich bezüglich der Konzentrationen der TTXs gute Vergleichbarkeiten. Ein Vorteil des Einsatzes der LC-MS/MS ist ein geringes Grundrauschen und eine hohe Selektivität und Sensitivität, da im verwendeten MRM-Modus die Detektion der Massenübergänge erfolgt, während im SIM-Modus der LC-MS-Methode einfache Masse-zu-Ladungsverhältnisse detektiert werden und somit die Selektivität geringer ist.

Aufgrund der chromatographischen Trennung mittels ZIC-HILIC-Säule und stabiler Retentionszeiten für die verschiedenen TTXs ist ihre eindeutige Quantifizierung auch mittels LC-MS möglich, und die Ergebnisse sind mit denen der LC-MS/MS-Bestimmungen vergleichbar.

Die Analyse bzgl. einer Kontamination mit PSP-Toxinen ergab lediglich in den Kugelfischen aus Japan das Vorkommen geringer Konzentrationen an STX, dcSTX und Neo neben TTXs. In den Hautgeweben der unbekannten Spezies aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama konnten im Vergleich zum Muskel- und Darmgewebe die höchsten Konzentrationen an PSP-Toxinen nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden für marine Kugelfische der Spezies *Takifugu pardialis* aus Japan erhalten, in denen in den untersuchten Geweben ebenfalls PSP-Toxine nachweisbar waren, jedoch TTXs als dominierende Toxine identifiziert werden konnten [88].

Es ergaben sich für die PSP-Toxinanalyse Probleme bezüglich der Nachweisempfindlichkeit einiger Toxine, sodass in einigen Proben z.B. die Gonyautoxine nicht detektiert werden konnten. Der Einsatz massenspektrometrischer Methoden bietet jedoch den Vorteil eines möglichen simultanen Nachweises von PSP-Toxinen und TTXs auch in Kugelfischen, sodass die Ursachen der Toxizität schnell und einfach ermittelt und die entsprechenden Toxine exakt quantifiziert werden können. Speziell massenspektrometrische Methoden zum Nachweis von PSP-Toxinen und TTXs in Kugelfischen sind hier besonders vorteilhaft einsetzbar, da wegen des gleichen neurotoxischen Wirkprinzips eine Unterscheidung zwischen beiden Toxingruppen bei Anwendung des MBA nicht möglich ist.

Die Entwicklung einer LC-MS/MS-basierten Multikomponentenmethode zum simultanen Nachweis von PSP-Toxinen und TTXs wird im nächsten Abschnitt dargestellt.

## **4.4 Entwicklung einer LC-MS/MS basierten Methode zur simultanen Erfassung von PSP-Toxinen und TTXs**

### **4.4.1 Einleitung**

Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Multikomponentenmethode zum simultanen Nachweis von PSP-Toxinen und TTXs war das ähnliche neurotoxische Wirkprinzip und dem darauf beruhenden Tierversuch (MBA) als Nachweisverfahren für beide Toxingruppen, der aber gegenwärtig immer noch vorrangig als offizielle Nachweismethode für PSP-Toxine und TTXs durchgeführt werden muss. Allerdings ist eine Überprüfung positiver MBA-Ergebnisse zur eindeutigen Bestimmung, welche Toxingruppe die toxische Wirkung verursacht hat, unumgänglich. In diesem Zusammenhang wurden chromatographische Methoden wie die HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion bzw. Methoden basierend auf der Kopplung LC-MS entwickelt, welche die Trennung und Quantifizierung aller relevanten PSP-Toxine bzw. TTXs in separaten chromatographischen Läufen ermöglichen [140, 146].

Sowohl PSP-Toxine als auch TTXs sind trotz unterschiedlicher chemischer Struktur sehr polare Substanzen und weisen ein ähnliches chromatographisches Verhalten bzgl. der Adsorption und Desorption im Zusammenhang mit der stationären und der mobilen Phase auf. Folglich ist es möglich, beide Toxingruppen mit HILIC-Säulen chromatographisch zu trennen.

Aufgrund der Tatsache, dass Kugelfische sowohl PSP-Toxine als auch TTXs enthalten können lag es nahe, eine Methode zum simultanen Nachweis beider Toxingruppen basierend auf dem Einsatz von LC-MS-Systemen unter Verwendung von HILIC-Säulen zu entwickeln. Die Methodenentwicklung wurde zunächst mittels LC-MS im SIM-Modus durchgeführt und anschließend auf die Kopplung LC-MS/MS übertragen, um die Vorteile der Detektion im MRM-Modus im Hinblick auf eine empfindliche und eindeutige Detektion dieser Toxine nutzen zu können.

### **4.4.2 Standardsubstanzen**

Zur Methodenentwicklung und Quantifizierung wurden folgende Toxinstandards verwendet: GTX1-4, dcGTX2/3, B1, C1/2, Neo, dcSTX und STX sowie ein TTX-Standard, welcher in geringen Konzentrationen AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX enthielt.

#### **4.4.3 Probenmaterial**

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode wurden die unter 4.3 beschriebenen Kugelfischextrakte aus Malaysia, Vietnam und Japan eingesetzt.

#### **4.4.4 Entwicklung einer Methode auf der Basis der LC-MS**

##### **4.4.4.1 Das LC-MS-System**

Das zur Methodenentwicklung verwendete LC-MS-System bestand aus einer HPLC-Anlage der Firma Agilent in Kombination mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer API 165 (AB Sciex).

##### **4.4.4.2 Optimierung der chromatographischen Trennung**

Für eine optimale chromatographische Trennung wurde neben ZIC-HILIC-Säulen unterschiedlicher Dimensionen auch eine Luna HILIC-Säule von Phenomenex (5 µm, 250 x 4,6 mm) getestet. Das Trennprinzip dieser Säule beruht auf am Kieselgel gebundenen, quervernetzten Diolphasen, wobei Ethylenbrücken als flexible kovalente Bindungen ausgebildet sind. Die Diolphasen ermöglichen eine gute Retention in der mit Wasser angereicherten Schicht auf der Kieselgeloberfläche, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und die Ausbildung pH-unabhängiger Wasserstoffbrückenbindungen.

Zur Überprüfung der Einsatzmöglichkeit dieser Säule für die chromatographische Trennung von PSP-Toxinen und TTXs wurden verschiedene Pufferkonzentrationen und Zusammensetzungen der Eluenten getestet. Eluent A bestand immer aus 100 % Wasser, während Eluent B neben 10 % Wasser 90 % Acetonitril als organischen Modifier enthielt. Zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen an Ammoniumformiat und Ameisensäure wurde den Eluenten zwischen 5 und 10 mM Ammoniumformiat und zwischen 0 und 53 mM Ameisensäure zugesetzt. Die Variation des Flusses der mobilen Phase erfolgte zwischen 0,7 und 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

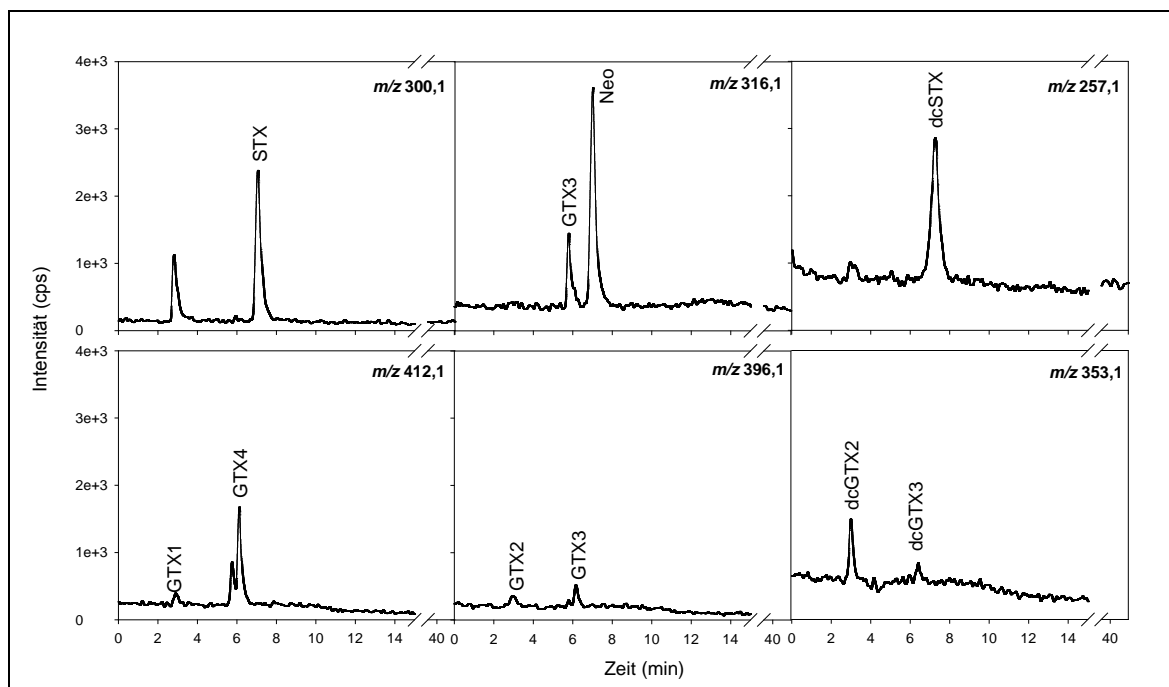
Die Trennleistung der Luna-HILIC-Säule wurde zunächst anhand von PSP-Toxinstandards getestet, eine Integration der TTXs sollte nach der Erzielung von guten Trennergebnissen und eines empfindlichen Nachweises für PSP-Toxine erfolgen.



Die bestmögliche Trennung der PSP-Toxine wurde unter Verwendung von 5 mM Ammoniumformiat und 53 mM Ameisensäure in den Eluenten A und B bei einem Fluss von  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  erzielt (Abb. 39), welcher vor Eintritt in die Ionenquelle 1:1 gesplittet wurde. Die Gradientenelution ist in Tab. 17 dargestellt.

**Tab. 17: Optimierte Gradientenelution zur Trennung von PSP-Toxinen mittels einer Luna-HILIC-Säule**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	20	80
5	20	80
7	40	60
26	40	60
28	20	80
40	20	80



**Abb. 39: LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) eines PSP-Standardmixes (11,5 ng STX, 12,72 ng dcSTX, 10,2 ng Neo, 43,8 ng GTX1, 46,7ng GTX2, 15,4 ng GTX3, 14,4 ng GTX4, 40,2 ng dcGTX2 und 11,3 ng dcGTX3) unter Verwendung einer Luna-HILIC-Säule bei einem Fluss von  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$**

Zur chromatographischen Trennung mittels ZIC-HILIC standen Säulen verschiedener Dimensionen zur Verfügung: eine Säule mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4,6 mm (ZIC-HILIC, 5  $\mu\text{m}$ , 100 A, 250 x 4,6 mm) und eine Säule mit einer Länge von 150 mm und einem Innendurchmesser von 2,1 mm (ZIC-HILIC, 5  $\mu\text{m}$ , 100 A, 150 x 2,1 mm). Der bereits unter 4.3.5 dargestellte Nachweis von TTXs mittels LC-MS und LC-MS/MS in Anlehnung an eine Methode von Diener et al. [146] erfolgte unter Verwendung letzterer Säule, welche ebenfalls zur chromatographischen Trennung von

PSP-Toxinen vor der massenspektrometrischen Detektion wie unter 4.3.7 beschrieben und bereits zur Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen eingesetzt wurde. Folglich bot sich die Testung speziell dieser ZIC-HILIC-Säule bei der Entwicklung einer simultanen Nachweismethode für PSP-Toxine und TTXs an.

Die Zusammensetzungen der Eluenten der Einzelmethode unterschieden sich leicht bzgl. der Konzentrationen an Ammoniumformiat und Ameisensäure während der Anteil von Acetonitril als organischem Modifier im Eluenten B jeweils 80 % betrug.

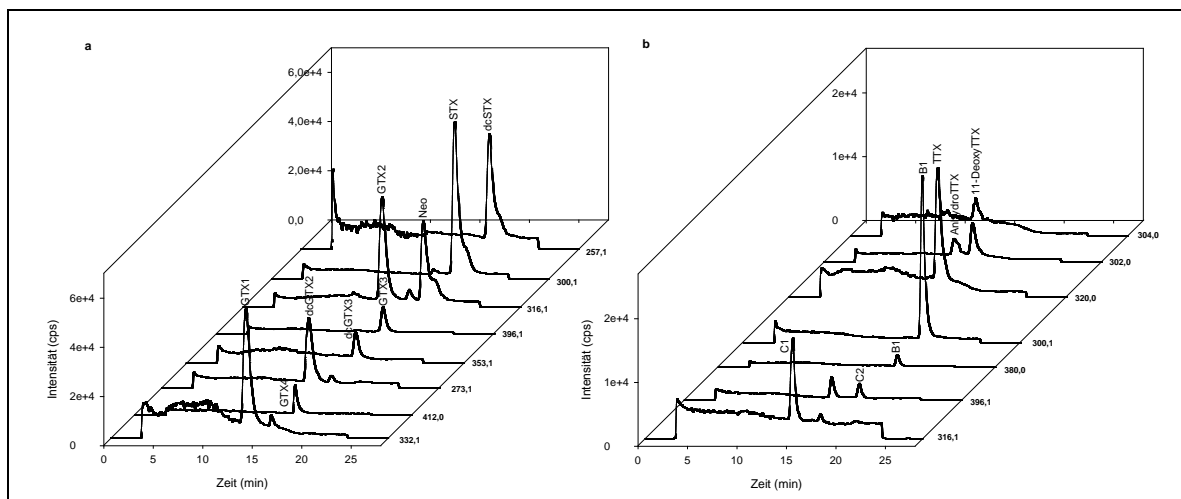
Die für eine optimale Trennleistung von PSP-Toxinen und TTXs in einem chromatographischen Lauf ermittelten Eluentenzusammensetzungen und das binäre Gradientenprogramm sind in Tab. 18 dargestellt. Die Flussrate der mobilen Phase betrug jeweils 0,25 mL min<sup>-1</sup>.

**Tab. 18: Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	10 mM Ammoniumformiat 10 mM Ameisensäure in 100 % Wasser	8 mM Ammoniumformiat 2 mM Ameisensäure in 80 % Acetonitril / 20 % Wasser (v/v)
0	0	100
3	0	100
9	50	50
11	50	50
13	75	25
21	75	75
24	0	100
28	0	100

Einige PSP-Toxine wie GTX2/GTX3 oder GTX1/4 treten als Epimere mit gleichem Molekulargewicht auf, sodass identische Masse-zu-Ladungsverhältnisse detektiert werden. Andererseits können durch Abspaltungen von Sulfatgruppen oder Wasser aus den Molekülen ebenfalls Fragmente entstehen, deren  $m/z$  mit denen anderer Toxine übereinstimmen. Im Falle von GTX2/3 ( $m/z$  396) entsteht durch Abspaltung von Sulfat  $m/z$  316, welches ebenfalls zur Detektion von Neo ( $[M+H]^+$ ) und C1 ( $[M+H-2SO_3]^+$ ) herangezogen wird. Nach einer Optimierung der chromatographischen Bedingungen und der daraus resultierenden Basislinientrennung der einzelnen Toxine gelang ihre Quantifizierung jedoch problemlos.

Eine separate Quantifizierung ist aufgrund stark unterschiedlicher Toxizitäten von großer Bedeutung. Abb. 40 zeigt die Chromatogramme im SIM-Modus detektierter PSP- bzw. TTXs-Standards.



**Abb. 40:** LC-MS-Chromatogramme (SIM-Modus) von PSP- und TTXs-Standards (11,5 ng STX, 12,7 ng dcSTX, 10,2 ng Neo, 43,8 ng GTX1, 46,7 ng GTX2, 15,4 ng GTX3, 14,4 ng GTX4, 40,2 ng dcGTX2, 11,3 ng dcGTX3 (a), 9,8 ng B1, 21,1 ng C2, 8,3 ng C2, 10 ng TTX, 0,7 ng AnhydroTTX und 0,7 ng 11-DeoxyTTX (b))

#### 4.4.4.3 Optimierung der MS-Parameter

Die Optimierung der MS-Parameter bildet die Basis einer sensitiven Methode. Die Detektion der PSP-Toxine und der TTXs erfolgt nach positiver Ionisierung im SIM-Modus. Zunächst wurden die  $m/z$  der als Standardsubstanzen vorhandenen PSP-Toxine und TTXs bei direkter Kopplung der HPLC ohne Einsatz einer Säule an das Massenspektrometer identifiziert. Die verwendeten Standards wurden direkt in die mobile Phase injiziert und zur Ionenquelle transportiert. Alle TTXs und die meisten der PSP-Toxine bilden bei der Ionisierung durch ESI einfach positiv geladene Molekülonen ( $[M+H]^+$ ), während bei den GTXs teilweise Sulfatgruppen abgespalten werden. Eine Anlagerung von  $NH_4^+$  führt bei den C-Toxinen häufig zur Bildung von  $[M+NH_4]^+$ -Ionen, deren Intensität wesentlich höher ist als die der einfach positiv geladenen Molekülonen.

Die zur späteren Quantifizierung im SIM-Modus verwendeten  $m/z$  der einzelnen Toxine sind in Tab. 19 aufgeführt. Es erfolgte die Optimierung für solche  $m/z$ , welche für die einzelnen Toxine die höchsten Intensitäten aufwiesen. So wurden z.B. bei den Epimeren GTX2/3 GTX3 anhand  $m/z$  396,1 ( $[M+H]^+$ ) und GTX2 anhand  $m/z$  316,1 ( $[M+H-SO_3]^+$ ) detektiert, obwohl beide Toxine aufgrund des gleichen Molekulargewichtes und identischer Fragmentierungen bei beiden  $m/z$  nachweisbar sind.

Die Dwell-Zeit aller Toxine (Zeitspanne in msec zur Ermittlung von Datenpunkten jedes einzelnen  $m/z$  bzw. Massenüberganges im Massenanalysator) betrug jeweils 90 msec.

**Tab. 19:  $m/z$  und Retentionszeiten von PSP-Toxinen und TTXs für die LC-MS-Bestimmung**

Toxin	$m/z$	Retentionszeit (min)
GTX1	$[M+H-SO_3]^+$ 332,1	$13,7 \pm 0,1$
GTX4	$[M+H]^+$ 412,1	$14,1 \pm 0,1$
GTX2	$[M+H-SO_3]^+$ 316,1	$16,8 \pm 0,1$
GTX3	$[M+H]^+$ 396,1	$16,2 \pm 0,1$
dcGTX2	$[M+H-SO_3]^+$ 273,1	$14,8 \pm 0,1$
dcGTX3	$[M+H]^+$ 353,1	$17,1 \pm 0,1$
C1	$[M+H-2SO_3]^+$ 316,1	$14,9 \pm 0,1$
C2	$[M+H-SO_3]^+$ 396,1	$17,6 \pm 0,1$
B1	$[M+H]^+$ 380,0	$17,9 \pm 0,1$
	$[M+H-SO_3]^+$ 300,1	
Neo	$[M+H]^+$ 316,1	$18,2 \pm 0,1$
STX	$[M+H]^+$ 300,1	$18,6 \pm 0,1$
dcSTX	$[M+H]^+$ 257,1	$19,0 \pm 0,1$
TTX	$[M+H]^+$ 320,0	$14,8 \pm 0,1$
AnhydroTTX	$[M+H]^+$ 302,0	$13,0 \pm 0,1$
11-DeoxyTTX	$[M+H]^+$ 304,0	$12,6 \pm 0,1$

Für die Methodenentwicklung wurden folgende MS-Parameter optimiert: IS, NEB, CUR, Temp, DP, FP und EP. Während für die Ionenquellenparameter IS, NEB, CUR und Temp der optimale Mittelwert aller Toxine in der Methode festgelegt wurde, erfolgte die Optimierung der substanzspezifischen Parameter DP, FP und EP für jedes Toxin individuell. Die ermittelten Werte sind in Tab. 20 dargestellt.

**Tab. 20: MS-Parameter für die Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

$m/z$	IS (V)	NEB (L h <sup>-1</sup> )	CUR (L h <sup>-1</sup> )	Temp (°C)	DP (eV)	FP (eV)	EP (eV)
412,1					15	160	2
332,1					25	160	7
396,1					7	150	1
316,1					30	160	4
353,1					15	150	3
273,1	4200	12	8	450	25	160	4
380,0					30	150	3
300,1					20	150	4
257,1					25	170	4
320,0					40	190	4
302,0					40	190	10
304,0					30	170	3

Außerdem wurden in die Methode die  $m/z$  weiterer TTXs aufgenommen, die bereits in die Einzelmethode einbezogen worden waren. Eine Optimierung für diese Toxine konnte aufgrund des Fehlens entsprechender Standards nicht durchgeführt werden, sodass die Parameter von TTX verwendet wurden.

#### 4.4.5 Übertragung der LC-MS-Methode auf die Kopplung LC-MS/MS

##### 4.4.5.1 Das LC-MS/MS-System

Das LC-MS/MS-System bestand aus einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu in Kombination mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 365 (AB Sciex).

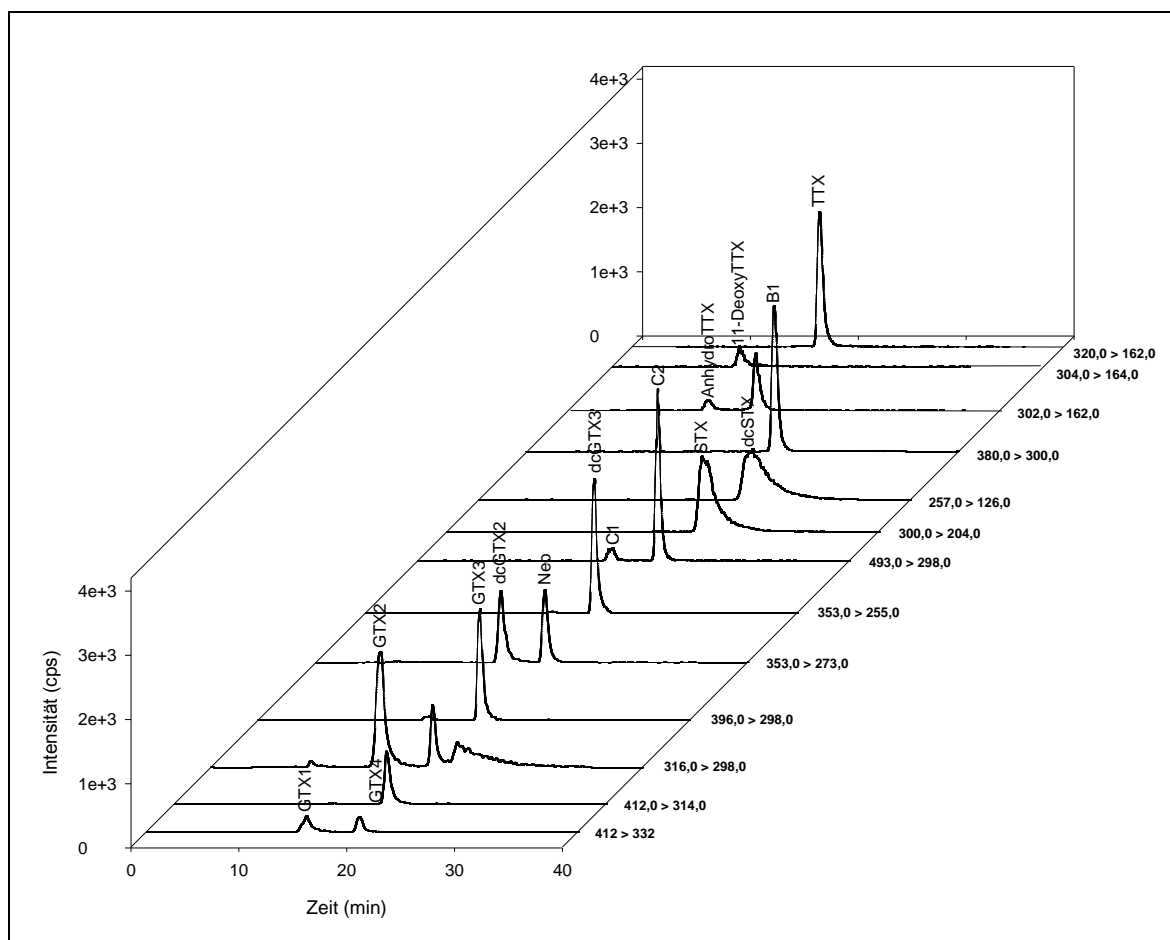
##### 4.4.5.2 Optimierung der chromatographischen Trennung

Die Optimierung der chromatographischen Trennung basierte auf der mittels LC-MS entwickelten Nachweismethode für PSP-Toxine und TTXs. Es erfolgte die Verwendung gleicher Eluenten sowie derselben ZIC-HILIC-Säule und eines Flusses der mobilen Phase von  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ . Das Gradientenprogramm wurde aufgrund der chromatographischen Trennung an einer anderen HPLC-Anlage neu optimiert (Tab. 21).

**Tab. 21: Eluentenzusammensetzung und Gradientenprogramm für die LC-MS/MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	10 mM Ammoniumformiat 10 mM Ameisensäure in 100 % Wasser	8 mM Ammoniumformiat 2 mM Ameisensäure in 80 % Acetonitril / 20 % Wasser (v/v)
0	10	90
1	40	60
10	40	60
15	10	90
40	10	90

Eine vollständige chromatographische Trennung aller relevanten PSP-Toxine und der TTXs -vergleichbar mit der LC-MS-Methode- wurde auch mit diesem LC-MS/MS-System erreicht, sodass auch hier eine separate Quantifizierung aller untersuchten Toxine möglich wurde (Abb. 41).



**Abb. 41: LC-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von PSP- und TTXs-Standards (21,5 ng STX, 12,0 ng dcSTX, 15,3 ng Neo, 43,8 ng GTX1, 46,7 ng GTX2, 15,4 ng GTX3, 14,4 ng GTX4, 40,2 ng dcGTX2, 11,3 ng dcGTX3, 9,3 ng B1, 40,7 ng C1, 12,5 ng C2, 10 ng TTX, 0,6 ng AnhydroTTX und 0,9 ng 11-DeoxyTTX)**

#### 4.4.5.3 Optimierung der MS/MS-Parameter

Neben den bereits zur Optimierung bei Einsatz des Single-Quadrupol-Massenspektrometers beschriebenen Ionenquellen- und Substanzparametern sind im Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zusätzlich noch die Kollisionsenergie (CE), das Eintrittspotential (CEP) und das Ausgangspotential an der Kollisionszelle (CXP) von Bedeutung. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nach positiver Ionisierung im MRM-Modus. Die MRM-Übergänge der einzelnen Toxine mit den höchsten Intensitäten wurden während der Methodenentwicklung durch Produktionscans ermittelt, die Parameter optimiert und anschließend in der Methode festgelegt (Tab. 22).

**Tab. 22: MRM-Übergänge von PSP-Toxinen und TTXs für die Bestimmung mittels LC-MS/MS**

Toxin	MRM-Übergang $m/z > m/z$		Retentionszeit (min)
GTX1	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3]^+$	412,0 > 332,0
GTX4	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3-H_2O]^+$	412,0 > 314,0
GTX2	$[M+H-SO_3]^+$	$> [M+H-SO_3-H_2O]^+$	316,0 > 298,0
GTX3	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3-H_2O]^+$	396,0 > 298,0
dcGTX2	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3]^+$	353,0 > 273,0
dcGTX3	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3-H_2O]^+$	353,0 > 255,0
C1	$[M+NH_4]^+$	$> [M+H-NH_3-2SO_3-H_2O]^+$	493,0 > 298,0
C2	$[M+NH_4]^+$	$> [M+H-NH_3-2SO_3-H_2O]^+$	493,0 > 298,0
B1	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3]^+$	380,0 > 300,0
Neo	$[M+H]^+$	$> [M+H-SO_3]^+$	316,0 > 298,0
STX	$[M+H]^+$	$> [M+H-2H_2O-NH_3-NHCO]^+$	300,0 > 204,0
dcSTX			257,0 > 126,0
TTX			320,0 > 162,0
AnhydroTTX			302,0 > 162,0
11-DeoxyTTX			304,0 > 164,0

PSP-Toxine sind relativ instabile Substanzen, sodass bereits beim Einsatz schwacher Fragmentierungsbedingungen im Q2 ein großes Spektrum an Produktionen gebildet wird, was für den Einsatz des MRM-Modus vorteilhaft ist. TTXs bilden im Gegensatz zu den PSP-Toxinen erst bei höherer Energiezufuhr Produktionen, beispielsweise liegen DP und CE bei den PSP-Toxinen zwischen 10 und 26 eV (DP) bzw. zwischen 15 und 30 eV (CE), während zur Fragmentierung der TTXs 40 eV für DP und 50 eV für CE notwendig sind. Wird bei der Optimierung der PSP-Toxine für DP ein zu hoher Wert gewählt, sind teilweise die Molekülonen ( $[M+H]^+$ ) nicht mehr erfassbar und somit keine MRM-Übergänge detektierbar. Die CE wurde so optimiert, dass die Molekülonen eine geringe Intensität aufwiesen, was zu einer hohen Intensität der entsprechenden Fragmentionen führte, sodass im MRM-Modus die stärkste Signalintensität erzielt wurde. In Tab. 23 sind die MS/MS-Parameter der relevanten PSP-Toxine und TTXs aufgeführt.

**Tab. 23: MS/MS-Parameter für die Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

MRM-Übergang $m/z > m/z$	IS (V)	NEB (L h <sup>-1</sup> )	CUR (L h <sup>-1</sup> )	Temp (°C)	DP (eV)	FP (eV)	EP (eV)	CEP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
412,0 > 332,0					19	250	9	12	18	25
412,0 > 314,0					18	220	10	5	28	20
316,0 > 298,0					18	150	10	9	25	18
396,0 > 298,0					26	210	3	11	15	16
353,0 > 273,0					15	150	4	12	18	15
353,0 > 255,0					15	150	3	6	24	19
493,0 > 298,0	4000	11	11	450	26	210	3	11	15	16
493,0 > 298,0					10	140	3	11	18	16
380,0 > 300,0					20	140	6	9	30	17
316,0 > 298,0					20	170	8	8	24	19
300,0 > 204,0					40	160	6	10	50	15
257,0 > 126,0					40	160	6	10	50	15
320,0 > 162,0					40	160	6	10	50	15

Als Beispiel des Optimierungsprozesses der Ionenquellen- und Substanzparameter sind in Abb. 42 die Signalintensitäten von GTX1 und GTX4 bei unterschiedlichen MS/MS-Parametern dargestellt. Die optimalen Werte für NEB und CUR betrugen für GTX1 ( $m/z$  412,0 >  $m/z$  332,0) und GTX4 ( $m/z$  412,0 >  $m/z$  314,0) 12 bzw. 8 L h<sup>-1</sup>, und sie unterscheiden sich von den in Tab. 23 dargestellten Werten, da der optimale Mittelwert der Ionenquellenparameter aller Toxine in der Methode festgelegt wurde.

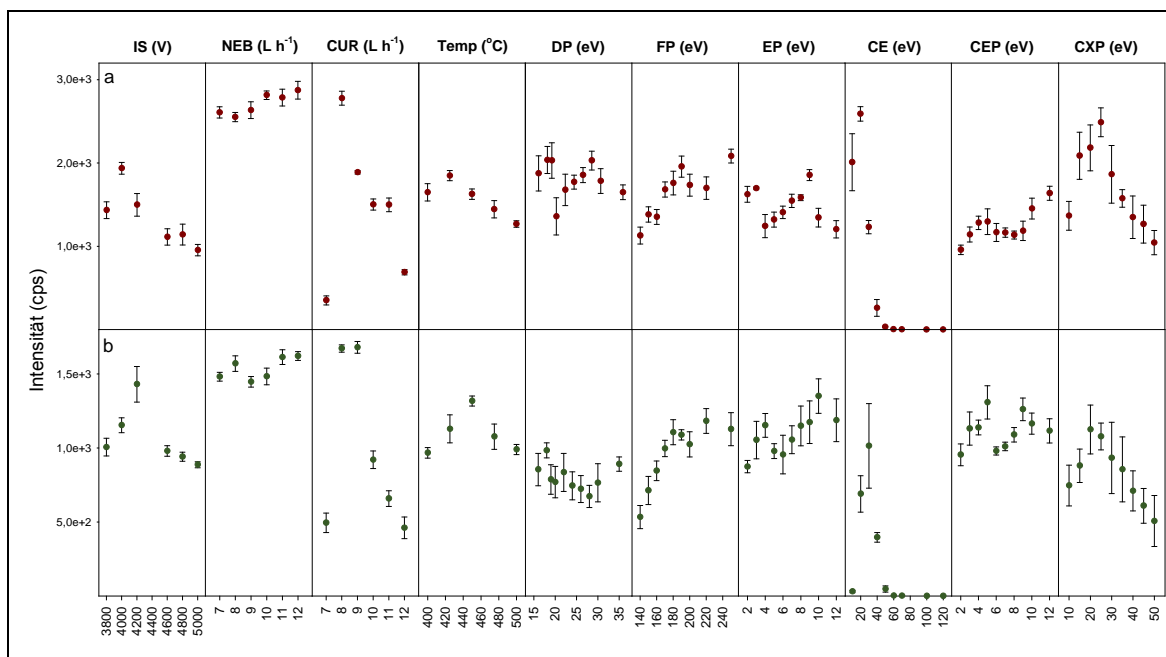


Abb. 42: Signalintensitäten (cps) von GTX1 (a) und GTX4 (b) für verschiedene MS/MS-Parameter während der Optimierung

#### 4.4.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der PSP-Toxine und der TTXs wurden die unter 4.4.2 beschriebenen Standardsubstanzen eingesetzt. Es wurde das Verhältnis der Peakhöhe der einzelnen Toxine zum Basislinienrauschen (S/N) in der Umgebung des Peakes bestimmt, wobei das Verhältnis für die Berechnung der LODs 3:1 und der LOQs 5:1 betrug. Die Quantifizierung der LC-MS-Methode erfolgte anhand der im SIM-Modus erstellten Chromatogramme der einzelnen Toxinstandards bekannter Konzentrationen.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach Analyse mittels LC-MS/MS sind im Vergleich zur LC-MS wesentlich geringer. Aufgrund der spezifischen Detektion der MRM-Übergänge ist das Basislinienrauschen kaum detektierbar, was selbst bei geringeren Intensitäten der einzelnen Toxine nach Berechnung von S/N zu niedrigeren LODs und



LOQs führt. Folglich ist die Detektion mittels LC-MS/MS im MRM-Modus empfindlicher und spezifischer (Tab 24; Anhang Tab. 52 und 53).

**Tab. 24: LODs (S/N 3:1) und LOQs (S/N 5:1) in ng on column für die LC-MS/MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

Toxin	LC-MS		LC-MS/MS	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
GTX1	2,2	3,7	0,37	0,62
GTX2	1,9	3,2	1,20	2,00
GTX3	2,5	4,2	0,20	0,33
GTX4	1,8	3,0	0,22	0,37
dcGTX2	3,5	5,8	0,40	0,67
dcGTX3	1,8	3,0	0,05	0,08
C1	3,5	5,8	1,20	2,00
C2	2,7	4,5	0,21	0,35
B1	1,8	3,0	0,15	0,25
Neo	1,0	1,7	1,20	2,00
STX	0,5	0,8	1,30	2,17
dcSTX	1,1	1,8	1,10	1,83
TTX	0,8	1,3	0,34	0,57
AnhydroTTX	0,8	1,1	0,31	0,52
11-DeoxyTTX	0,9	1,5	0,35	0,58

#### 4.4.7 Diskussion der Ergebnisse

##### 4.4.7.1 Chromatographische Trennung

Zur Optimierung der chromatographischen Trennung wurden im LC-MS-System zwei verschiedene HILIC-Säulen getestet. Der Einsatz einer Luna-HILIC-Säule erwies sich aufgrund des durch den Innendurchmesser von 4,6 mm bedingten hohen Flusses von  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  selbst nach einer Splittung von 1:1 als nicht optimal. Bei Verwendung der ESI sollten möglichst kleine Flussraten gewählt werden, da ein hoher Fluss zur Bildung von zu großen Lösungsmitteltröpfchen führt, deren Verdampfung nur unzureichend erfolgen kann und niedrigere Empfindlichkeiten verursacht. Die geringen Empfindlichkeiten zeigten sich auch in den Messungen, da trotz Injektion großer Toxinmengen die Intensitäten im Vergleich zu den Ergebnissen der nachfolgend getesteten ZIC-HILIC-Säule wesentlich niedriger waren, insbesondere für GTX1, GTX2 und dcGTX3. Eine Trennung von C1 und C2 konnte mit der Luna-HILIC-Säule ebenfalls nicht zufriedenstellend erreicht werden.

Mit der ZIC-HILIC-Säule, welche bereits zur separaten Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs eingesetzt worden ist, konnte sowohl für die Entwicklung einer Nachweismethode mittels LC-MS als auch mittels LC-MS/MS eine gute chromatographische Trennung aller

relevanten Toxine erzielt werden. Aufgrund des Innendurchmessers von 2,1 mm wurde im Gegensatz zur Luna-HILIC-Säule ein geringer Fluss der mobilen Phase gewählt. Die Intensitäten der PSP-Toxine bei Einsatz der LC-MS lagen bei Verwendung der ZIC-HILIC um mehr als ein Zehnfaches über den mittels der Luna-HILIC-Säule erzielten Intensitäten, sodass die Methodenentwicklung am LC-MS-System mit der ZIC-HILIC-Säule optimiert und das Resultat anschließend auf das LC-MS/MS-System übertragen wurde.

Mit der als Endergebnis erstellten LC-MS/MS-Methode ist eine vollständige chromatographische Trennung aller PSP-Toxine und TTXs möglich. Die Retentionszeiten der Toxine liegen im Bereich 11,6 min und 25,1 min. Der Einsatz flüchtiger Puffersubstanzen in niedrigen Konzentrationen bei gleichzeitig hohem Acetonitrilgehalt in der mobilen Phase ermöglicht sowohl eine gute Trennung als auch eine effektive Ionisierung der Toxine mittels ESI, was zu einer empfindlichen massenspektrometrischen Detektion führt.

#### 4.4.7.2 MS- und MS/MS-Parameter

Die auf einer MS/MS-Detektion basierenden Methoden werden wegen der damit erreichbaren hohen Selektivität und Sensitivität im MRM-Modus durchgeführt, der für die Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs gut geeignet ist. Im Gegensatz zu anderen Substanzen kommt es bei diesen beiden Toxingruppen innerhalb der Strukturen selten zu Veränderungen im Molekül und somit nicht zur Entstehung von Strukturvarianten, die im MRM-Modus zu falsch-negativen Ergebnisse führen könnten.

Die Ionenquellen- und Substanzparameter wurden sowohl für die Detektion mittels LC-MS als auch mittels LC-MS/MS optimiert, wobei bei den Ionenquellenparametern IS, NEB, CUR und Temp ein Kompromiss zwischen den optimalen Werten der einzelnen PSP-Toxine und der TTXs gewählt und lediglich die substanzspezifischen optimierten MS-Parameter für die Toxine beider Gruppen in die Methoden integriert wurden.

PSP-Toxine sind relativ instabile Moleküle, sodass bereits bei niedrigen Werten der substanzspezifischen MS-Parameter und auch schon während der Ionisierung ein großes Spektrum an Fragmentationen gebildet werden kann. Hingegen entstehen aus den stabileren TTXs bei der ESI ausschließlich Molekülionen mit einfachem Ionisierungsgrad, welche erst nach Anwendung stärkerer Fragmentierungsbedingungen in spezifische Fragmente zerfallen. Die MRM-Übergänge der einzelnen PSP-Toxine und TTXs wurden anhand der Stärke der Intensitäten ausgewählt und optimiert und ermöglichen eine selektive Detektion bei niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

#### 4.4.8 Anwendung der LC-MS/MS-Methode

Die Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode unter Verwendung des MRM-Modus basierend auf einer zuvor erstellten LC-MS-Methode ermöglichte die Untersuchung von Probenextrakten hinsichtlich des Vorkommens von sowohl PSP-Toxinen als auch TTXs in einem chromatographischen Lauf. Dies ist vor allem im Hinblick auf Kontrollen von Kugelfischen, in denen beide Toxingruppen vorhanden sein können, von Bedeutung. Bei Einsatz der LC-MS/MS-Methode ist ein schneller, empfindlicher und eindeutiger Nachweis der verschiedenen PSP-Toxine und TTXs möglich.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der entwickelten LC-MS/MS-Methode wurden Kugelfischextrakte aus Malaysia, Vietnam und Japan hinsichtlich ihrer Toxinprofile untersucht. Abb. 43 zeigt als Beispiel das Chromatogramm der LC-MS/MS-Analyse des Extraktes der Haut eines Kugelfisches aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama in Japan.

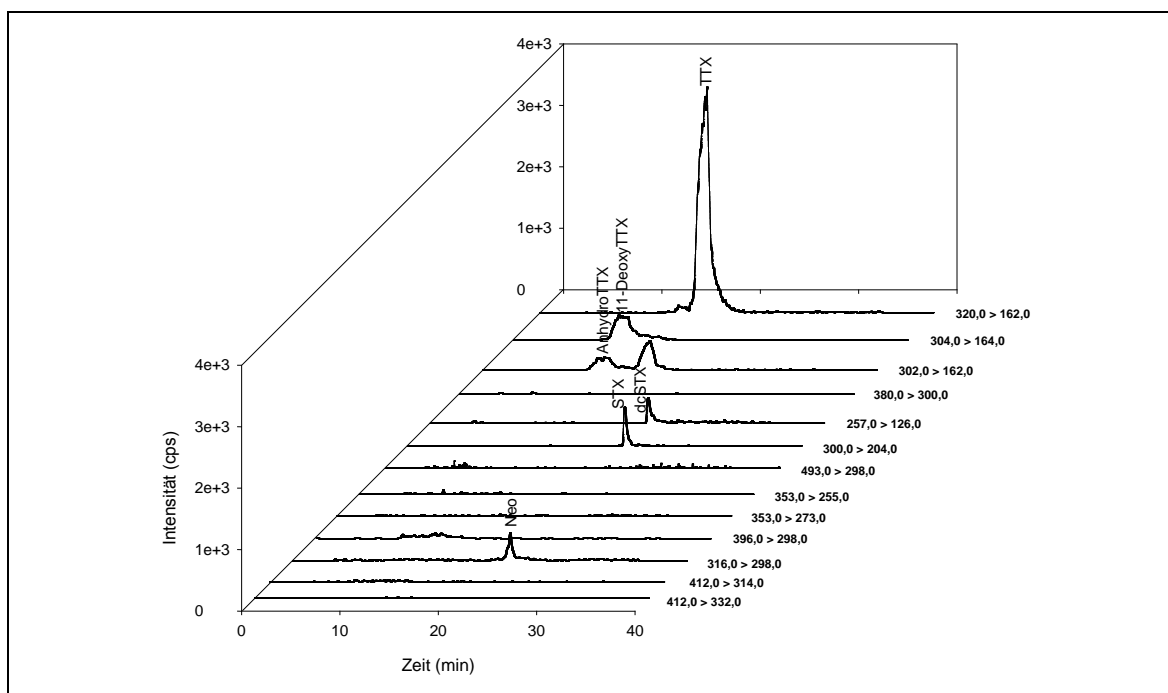
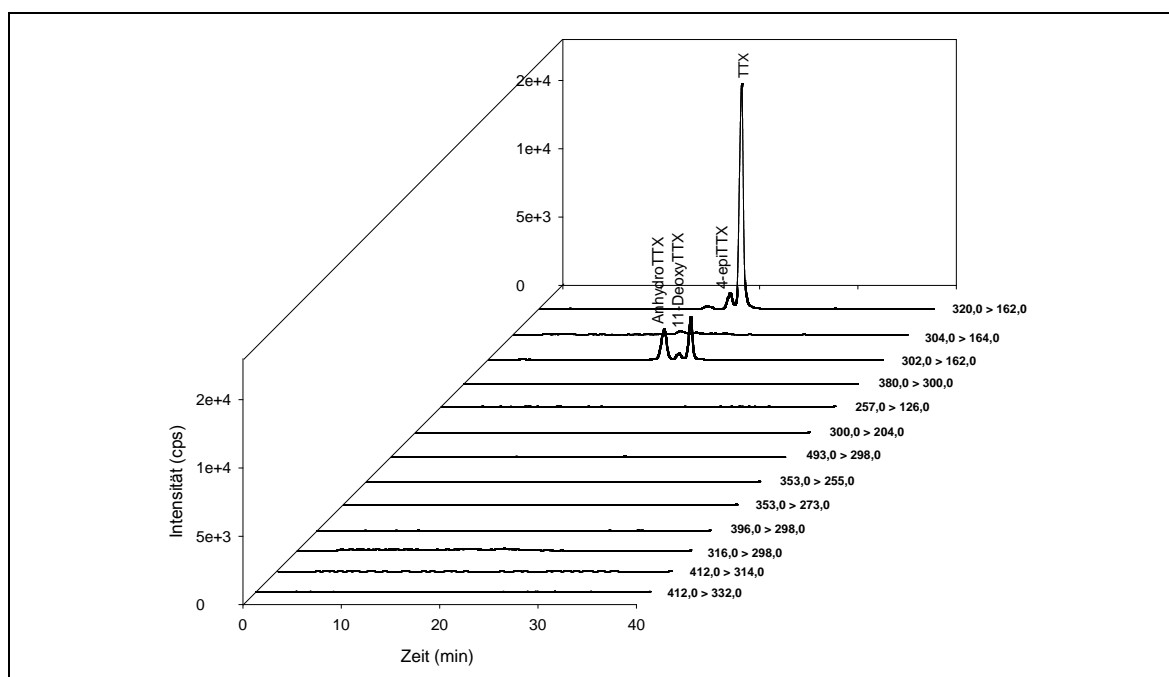


Abb. 43: LC-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) eines Kugelfischextraktes (Haut) aus der Küstenregion der Präfektur Wakayama in Japan

Während in den Kugelfischen aus Japan neben TTXs auch PSP-Toxine nachgewiesen werden konnten, enthielten die untersuchten Kugelfische aus Malaysia und Vietnam lediglich TTXs.

In Abb. 44 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Gonaden von *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia mittels LC-MS/MS dargestellt.



**Abb. 44: LC-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) eines Extraktes von *Lagocephalus wheelerie* (Gonaden) aus Malaysia**

Sowohl bei Einsatz der LC-MS als auch der LC-MS/MS ergaben sich für die PSP-Toxinanalysen Probleme bezüglich der Nachweisempfindlichkeit für einige Toxine, sodass z.B. die GTXs aufgrund niedriger Konzentrationen in den Proben nicht detektiert werden konnten. Die Ergebnisse der Analyse von STX, dcSTX und Neo als auch der TTXs zeigten jedoch gute Übereinstimmungen mit denen der Einzelmethode, wobei die LODs der neu entwickelten Methode etwas höher lagen, was durch die Vielzahl von den in der Methode enthaltenen MRM-Übergängen erklärbar ist.

Die neu entwickelte LC-MS/MS-Methode ermöglicht dennoch eine schnelle und exakte Analyse der Belastung von Kugelfischen mit beiden Toxingruppen nach nur einem chromatographischen Lauf, was im Rahmen von Routineuntersuchungen von Vorteil ist.

Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch die Analyse verschiedener Kugelfische unterschiedlicher Provenienz demonstriert.

## **5 ZUSAMMENFASSUNGEN**

### **5.1 Zusammenfassung**

Schädliche Wirkungen mariner Biotoxine durch Massenvermehrungen von Algen (HABs), aber auch durch bakteriell produzierte Toxine sind seit langem bekannt. Eine Gefährdung des Menschen besteht unter anderem nach dem Verzehr von mit Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)-Toxinen kontaminierten marinen Lebensmitteln. Eine weitere Ursache von Lebensmittelvergiftungen kann auf einer Anreicherung von durch Bakterien gebildeten Tetrodotoxinen (TTXs) in Meerestieren und Fischen des asiatischen Raumes beruhen.

Die Einhaltung der Grenzwerte bezüglich einer Kontamination mariner Lebensmittel mit PSP-Toxinen und TTXs erfordert Kontrollen, und hierfür ist die Entwicklung leistungsfähiger Analysenmethoden zum eindeutigen Nachweis sowohl der rechtlich relevanten PSP-Toxine als auch der TTXs unbedingt notwendig.

PSP-Toxine und TTXs weisen unterschiedliche chemische Strukturen auf, jedoch besitzen beide Toxingruppen Guanidinogruppen im Molekül, welche vergleichbare neurotoxische Wirkungen durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle hervorrufen. Auch bewirken verschiedene Strukturvarianten innerhalb der PSP-Toxine und der TTXs aufgrund verschiedener funktioneller Gruppen im Molekül unterschiedliche Toxizitäten gemessen als letale Dosen ( $LD_{50}$ ) im Tierversuch (z.B. Mausbioassay). Unabhängig davon bleibt, bedingt durch eine ähnliche Wirkung beider neurotoxischen Toxingruppen, ihr Nachweis mittels Mausbioassay als offizielle Nachweismethode für PSP-Toxine und TTXs problematisch, sodass bei positiven Ergebnissen des Mausbioassay zusätzlich chromatographische Analysenmethoden zum Nachweis, welche Toxingruppe die toxische Wirkung verursacht hat, einzusetzen sind.

In diesem Zusammenhang ist es von nicht zu unterschätzender Bedeutung, wenn bei der Entwicklung von LC-MS/MS basierten Analysenmethoden darauf geachtet wird, dass sogenannte Multikomponentenmethoden zur Verfügung stehen, welche die simultane Erfassung der unterschiedlichen Toxine nach nur einem chromatographischen Lauf gestatten.

Da Intoxikationen des Menschen durch PSP-Toxine meistens durch den Verzehr kontaminierter Krusten- und Schalentiere hervorgerufen werden, sind Untersuchungen

von Akkumulations- und Metabolisierungsprozessen von PSP-Toxinen in diesen Organismen von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die die Akkumulation und Metabolisierung von PSP-Toxinen durch Miesmuscheln der Art *Mytilus edulis* nach Intoxikation mit verschiedenen Strains von *Alexandrium* spp. in einem *in vivo* Fütterungsversuch untersucht werden.

In den Fütterungskulturen *A. minutum* und *A. ostenfeldii* und den Miesmuscheln waren die gleichen PSP-Toxine nachweisbar, jedoch veränderten sich die Toxinprofile. Während in den Kulturen vorrangig die  $\beta$ -Epimere der PSP-Toxine detektiert wurden, konnten in den Miesmuscheln nach Intoxikation vorrangig die korrespondierenden, thermostabileren  $\alpha$ -Epimere nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Transformation von GTX3 zu GTX2 bzw. GTX4 zu GTX1.

Ein weiterer Umwandlungsprozess, der in Muscheln nach Intoxikation mit *A. minutum*, nicht jedoch mit *A. ostenfeldii* beobachtbar war, basierte auf reduktiven Transformationen der PSP-Toxine mit einer N1-OH-Gruppe (GTX1 und GTX4) zu PSP-Toxinen mit einer N1-H-Gruppe im Molekül (GTX2 und GTX3), die ebenfalls zu einer Veränderung des Toxinprofils und damit zu Änderungen der PSP-Gesamttoxizität führten.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bezüglich der PSP-Toxine lag in der Charakterisierung eines PSP-Toxins aus dem Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC) mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion wurde im Strain ITEP-018 eine unbekannte Substanz (U1) detektiert, die nach saurer Hydrolyse des Extraktes in eine andere Substanz (U2) umgewandelt wurde. Beide Substanzen zeigten nur nach Derivatisierung Fluoreszenz, was auf eine strukturelle Ähnlichkeit dieser Substanzen mit den PSP-Toxinen hinwies.

Nach Isolation der unbekannten Substanz U1 und deren Hydrolyseprodukt U2 wurden diese mittels Triple-Quadrupol-, Q Trap- und hochauflösender Massenspektrometrie charakterisiert. Für U1 ergab sich ein Verhältnis  $m/z$  426 und für U2  $m/z$  346. Weiterhin wurden die Fragmentierungen von U1 und U2 untersucht. Es ergaben sich für U1 Hauptfragmente mit  $m/z$  346, 348 und 299 sowie für U2 Fragmente ausgehend von  $m/z$  346.

Die Untersuchung der elementaren Zusammensetzung von  $m/z$  426 und 346 bestätigten die Richtigkeit einer Zuordnung von U1 und U2 zu den PSP-Toxinen, zumal U1 im Vergleich zu GTX1/4 laut Summenformel bei einer ansonsten vergleichbaren Zusammensetzung eine Methylgruppe mehr im Molekül aufweist. Allerdings weisen die

unterschiedlichen Fragmentierungsspektren von U1 und GTX4 darauf hin, dass es sich bei U1 nicht einfach um ein methyliertes GTX1/4 handelt. Wahrscheinlicher stellt U1 ein N-Sulfocarbamoyltoxin dar, welches sowohl nach saurer Hydrolyse und der damit verbundenen Entstehung von U2 als auch beim Fragmentierungsprozess eine Sulfatgruppe abspaltet, denn bei den Carbamoyltoxinen ist die saure Hydrolyse nicht mit einer Abspaltung von Sulfat verbunden. Dennoch erscheint aufgrund der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen eine Zuordnung von U1 und seines Hydrolyseproduktes U2 zu den PSP-Toxinen gerechtfertigt.

Inzwischen konnten beide Substanzen in weiteren Strains von *Cylindrospermopsis raciborskii* nachgewiesen werden. Die Bildung ist demnach nicht nur auf ITEP-018 beschränkt. Für eine zukünftige exakte Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wird zur Zeit der Strain ITEP-A1 am AWI Bremerhaven kultiviert.

Bezüglich der Problematik des Vorkommens von PSP-Toxinen und TTXs in Kugelfischen waren Proben verschiedener Herkunft hinsichtlich einer Kontamination mit beiden Toxingruppen unter Einsatz von Einzelmethoden zu untersuchen, denn in unterschiedlichen Kugelfischspezies konnten bereits in der Vergangenheit neben TTXs auch PSP-Toxine nachgewiesen werden.

Nach einer Optimierung und Weiterentwicklung von Einzelmethoden auf Basis der HILIC wurden verschiedene Gewebe von Kugelfischen aus Malaysia und Vietnam sowie aus Japan hinsichtlich ihrer Gehalte an TTXs und PSP-Toxinen untersucht. In den Gonaden und im Muskelgewebe von *Lagocephalus wheelerie* aus Malaysia konnten die höchsten Konzentrationen an TTX ermittelt werden, die mit den TTX-Gehalten der Haut einer Kugelfischspezies aus der Küstenregion Japans vergleichbar waren. Damit können die Ergebnisse früherer Untersuchungen, dass marine Kugelfische wie *Lagocephalus wheelerie* TTX vorrangig in Leber und Gonaden anreichern, während Brackwasserkugelfische die höchsten Konzentrationen in der Haut aufweisen, bestätigt werden.

In allen untersuchten Kugelfischen konnten außer TTX, 4-epiTTX, AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX keine weiteren TTXs nachgewiesen werden.

Lediglich in den Kugelfischproben aus Japan waren PSP-Toxine detektierbar, jedoch waren deren Konzentrationen im Vergleich zu den ermittelten TTXs-Gehalten vergleichsweise gering.

Eine Gegenüberstellung der TTXs-Analysen mittels LC-MS und LC-MS/MS ergab vergleichbare Ergebnisse, jedoch zeigte sich, dass die Selektivität bei Messungen im MRM-Modus mittels LC-MS/MS sehr viel höher ist.

Zur Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode für beide Toxingruppen wurden zunächst verschiedene HILIC-Säulen getestet. Das beste Trennergebnis wurde mit einer schon bei den Einzelmethodeen erwähnten ZIC-HILIC-Säule erzielt. Ammoniumformiat und Ameisensäure als flüchtige und somit für die massenspektrometrische Detektion geeignete Puffer in der mobilen Phase erlauben auch den Nachweis extrem wasserlöslicher Substanzen wie z.B. STX, wobei die ZIC-HILIC-Säule die Trennung aller bekannten PSP-Toxine sowie der TTXs bei relativ stabilen Retentionszeiten gewährleistet.

Zunächst erfolgte die Methodenentwicklung mittels LC-MS, deren Ergebnisse im Anschluss auf die LC-MS/MS übertragen wurden. Nach Optimierung der massenspektrometrischen Parameter wurde für die LC-MS-Analytik eine SIM- und für die LC-MS/MS-Bestimmung eine MRM-Methode entwickelt.

Der MRM-Modus beim Einsatz von LC-MS/MS-Systemen ist durch die Detektion von Massenübergängen im Vergleich zur LC-MS-Analytik spezifischer und empfindlicher.

Die Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode wurde durch Analysen von Kugelfischen verschiedener Herkunft überprüft und mit den Ergebnissen der Einzelmethodeen zur Bestimmung von PSP-Toxinen bzw. TTXs verglichen, wobei gut korrelierende Ergebnisse erhalten wurden.

Als Fazit ergibt sich, dass die entwickelte LC-MS/MS-Methode als Multikomponentenmethode einen schnellen, spezifischen und sensitiven Nachweis der PSP-Toxine und der TTXs in einem chromatographischen Lauf ermöglicht, sodass diese Methode insbesondere bei der Untersuchung von Kugelfischen bzgl. ihrer Toxizität einsetzbar ist.



## 5.2 Summary

Hazardous impacts of marine biotoxins are caused by an extensive increase of toxic microalgae (HABs) as well as by the production of toxins by different species of bacteria. Humans are endangered, amongst others, by the consumption of seafood contaminated with paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. Further causes of food poisoning can be the consumption of marine organisms containing tetrodotoxins (TTXs) especially in Asia. The adherence of limit values concerning the contamination of food by PSP toxins and TTXs require inspections for which the development of powerful and sensitive methods of analysis for the unambiguous determination of PSP toxins and TTXs is necessary.

PSP toxins and TTXs possess different structures, but both toxin groups contain structural similarities like guanidine groups, which cause a comparable neurotoxic mode of action by the inhibition of voltage-dependent sodium channels. Due to different functional groups in the molecule, the variants of the PSP toxins and TTXs differ each in their toxicity measured as lethal doses (LD<sub>50</sub>) in animal experiments. Because of the similar toxic principle, obtaining positive results by the mouse bioassay as the official method of detection is problematic. They have to be confirmed with respect to the causative toxin group and consequently, the application of chromatographic methods is necessary.

Human intoxication with PSP toxins is often caused by the consumption of contaminated shellfish. Therefore, knowledge concerning the toxins' dispositions within the food chain is important to understand the influence of biotransformation of PSP toxins in shellfish.

An aim of this work was to examine the accumulation and metabolism of PSP toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) after feeding on different strains of *Alexandrium* spp.

In the cultures of *A. ostenfeldii* and *A. minutum* and in the blue mussels the same PSP toxins were detectable, but changes with regard to the toxin profile occurred. In the feed cultures mainly  $\beta$ -epimers of PSP toxins were detected whereas after accumulation in *M. edulis* the percentages of the corresponding thermodynamic more stable  $\alpha$ -epimers became dominant. The transformation of GTX3 into GTX2 and GTX4 into GTX1 was detectable.

Furthermore, in mussels fed on *A. minutum* but not in mussels fed on *A. ostenfeldii* reductive transformations of PSP toxins with a N1-OH toxin group (GTX1/4) to the PSP toxins with a N1-H group (GTX2/3) were observed that also led to a change in the toxin profile.

A second focal point of this work was to characterize an unknown PSP toxin which is produced by the cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*.

The unknown substances were detected by using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with post-column derivatization and fluorescence detection. It was demonstrated that in the strain ITP-018 an unknown substance (U1) exists which is transformed into a new one (U2) after acid hydrolysis. In comparison to PSP toxins, both substances show fluorescence activity only after derivatization that refers to structural similarities.

The analysis of U1 and the corresponding hydrolysis product U2 was carried out by the application of Triple-Quadrupole-, Q Trap- and high resolution mass spectrometry. As a result, for U1  $m/z$  426 and for U2  $m/z$  346 was identified. Furthermore, the fragmentation patterns of U1 and U2 were examined and  $m/z$  346, 348 and 299 were detected as main fragments of U1 whereas for U2 fragments starting from  $m/z$  346 were found.

The results of the analysis concerning the chemical composition of  $m/z$  426 and 346 confirmed the correlation of U1 and U2 with the PSP toxins. The molecular formula of U1 is similar to GTX1/4 and refers to one more methyl group in the structure.

However, the different fragmentation patterns of U1 and GTX4 show that U1 cannot be described as a methylated GTX1/4. It is more probable that U1 can be integrated to the N-sulfocarbamoyltoxins which are characterized by the elimination of a sulfate group after acid hydrolysis (and the transformation to U2) as well as during the fragmentation while mass spectrometric analysis. By acid hydrolysis, carbamoyltoxins like GTX1/4 are not able to eliminate sulfate groups. Overall, the integration of U1 and the corresponding hydrolysis product U2 into the group of PSP toxins is justified.

Both substances were also detected in other strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* and so the production is not limited to ITP-018. Future analyses concerning the determination of the exact structure by the application of NMR will be done. For this purpose, at the AWI Bremerhaven the cultivation of ITP-A1 is in progress.

One of the targets during the work was the determination of PSP toxins and TTXs in puffer fish of different provenience. Independently of the presence of TTXs in puffer fish toxicity can also be induced by PSP toxins.

Subsequently to the optimization and the advancement of the separate determination methods for PSP toxins and TTXs, sample material of marine puffer fish from Malaysia, Vietnam and from the coastal area as well as from brackish water in Japan were analyzed. The largest concentrations of TTX were detected in the ovaries and the muscle tissue of *Lagocephalus wheelerie* from Malaysia and the results were comparable to the concentrations detected in the skin of an unknown puffer fish from Japan. The

accumulation of TTX priority in the liver and the ovaries in marine puffer fish like *Lagocephalus wheelerie* which was shown in past studies could be confirmed. In puffer fish from brackish water the accumulation of TTX is dominated in the skin.

In all samples of puffer fish no more TTXs besides TTX, 4-epiTTX, AnhydroTTX and 11-DeoxyTTX were detected.

In contrast to puffer fish from Malaysia and Vietnam, puffer fish from Japan was contaminated with PSP toxins in addition to higher concentrations of TTXs.

The results of the determination of TTXs by LC-MS and LC-MS/MS showed similar results but the selectivity of the analysis in MRM mode by LC-MS/MS was higher.

Another aim of the work was the development of a multi compound method based on LC-MS/MS for the simultaneous determination of PSP toxins and TTXs.

Different types of HILIC columns and mobile phases were tested to reach complete separation and sensitive mass spectrometric detection and the best results were obtained by the use of the ZIC-HILIC column which was still applied for the separate analyses of PSP toxins and TTXs. The application of this column allows the complete separation and mass spectrometric detection of the PSP toxins and TTXs by the use of mobile phases containing high amounts of organic solvents and low buffer concentrations.

Initially, the simultaneous method for the determination of PSP toxins and TTXs was developed by the application of the LC-MS and the results were transferred to the LC-MS/MS. Subsequently to the optimization of the mass spectrometric parameters, a method in SIM mode for the analysis by LC-MS and a method in MRM for the analysis by LC-MS/MS mode were developed.

In comparison to the analysis by LC-MS, the application of MRM methods by LC-MS/MS is more specific and sensitive.

Samples of puffer fish of different provenience were analyzed to demonstrate the practicability of the new method. Due to the fact that the results of this method were correlating with the results from the separate determination methods for PSP toxins and TTXs the availability of the new method was demonstrated.

In summary, it was shown that the presented multi compound method allows the fast and unambiguous chromatographic separation and detection of PSP toxins and TTXs in seafood with regard to international legislation concerning contamination with both toxin groups in one chromatographic run. As a result, only one LC-MS/MS method is necessary especially for the determination of the toxicity of puffer fish.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Anderson DM, White AW, 1992. Marine biotoxins at the top of the food chain. *Oceanus*, 1992. **35**, S. 55-61.
- [2] Shumway SE, Phycotoxin related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.*, 1995. **3**, S. 1-31.
- [3] Hallegraeff GM, Harmful Algal Blooms: A global overview. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Eds.), Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and Guides 33, UNESCO, Paris, 1995. S. 1-24.
- [4] Yasumoto T, Marine microorganisms toxins – an overview. In: Granéli E, Sundström B., Edler L., Anderson DM (Eds.), Toxic marine phytoplankton. Elsevier, Amsterdam, 1989. S. 3-8.
- [5] Sournia A, Chrédiennot-Dinet MJ, Ricard M, Marine phytoplankton: how many species in the world ocean?. *J. Plankton Res.* 1991. **13**, S. 1093-1099.
- [6] Maso M, Garces E, Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin* 2006: **53**, S. 620-630.
- [7] Steidinger KA, Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. In: Falconer IR (Ed.), Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press, London, 1993. S. 1-28.
- [8] Mahmood NA, Carmichael WW, Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 1986. **24**, S. 175-186.
- [9] Hall S, Strichartz GR, Moczydlowski E, Ravindran A, Reichardt PB, The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall S, Strichartz GR (Eds.), Marine toxins. American Chemical Society, Washington D.C., 1999. S. 29-65.
- [10] Onodera H, Satake M, Oshima Y, Yasumoto T, Carmichael WW, New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Nat. Tox.*, 1997. **5**, S. 146-151.
- [11] Lagos NW, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo SMFQ, Oshima Y, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 1999. **37**, S. 1359-1373.
- [12] Pomati F, Sacci S, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, Neilan BA, The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.*, 2000. **36**, S. 553-562.
- [13] Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW, Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Publishing, Paris, 1997. S. 48-52.
- [14] Falconer IR, Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press Limited, London, 1993. S. 1-6.
- [15] Anderson DM, Physiology and bloom dynamics of toxic Alexandrium species, with emphasis on life cycle transitions. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (Eds.), Physiological ecology of harmful algal blooms. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998. S. 29-48.

- [16] Hansen PJ, Cembella AD, Moestrup Ø, The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: Paralytic shellfish toxin concentration, composition and toxicity to a tintinnid ciliate. *J. Phycol.*, 1992. **28**, S. 597-603.
- [17] Cembella AD, Lewis NI, Quilliam MA, The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*, 2000. **39**, S. 67-74.
- [18] Kremp A, Lindholm T, Dreßler N, Erler K, Gerdtz G, Eirtovaara S, Leskinen E, Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland Archipelago, Northern Baltic Sea. *Harmful Algae*, 2009. **8**, S.318-328.
- [19] Chang FH, Anderson DM, Kulis DM, Till DG, Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon*, 1997. **35**, S. 393-409.
- [20] Hansen G, Daugbjerg N, Franco JM, Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae*, 2003. **2**, S. 317-335.
- [21] Nascimento SM, Purdie DA, Lilly EL, Larsen J, Morris S, Toxin profile, pigment composition and large subunit rDNA phylogenetic analysis of an *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) strain isolated from the Fleet Lagoon, United Kingdom. *J. Phycol.*, 2005. **41**, S. 343-353.
- [22] Selander E, Thor P, Toth G, Pavia H, Copepods induce paralytic shellfish toxin production in marine dinoflagellates. *Proc. R. Soc. B.*, 2006. **273**, S. 1673-1680.
- [23] Touzet N, Franco JM, Raine R, Characterization of non-toxic and toxin-producing strains of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007. **73**, S. 3333-3342.
- [24] Hallegraeff GM, Steffensen DA, Wetherbee R, Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *J. Plankton Res.*, 1988. **10**, S. 533-41.
- [25] Flynn K, Franco JM, Fernandez P, Reguera B, Zapata M, Wood G, Flynn KJ, Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1994. **111**, S. 99-109.
- [26] Anderson DM, Kulis DM, Sullivan JJ, Hall S, Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon*, 1990. **28**, S. 885-893.
- [27] Shimizu Y, Alam M, Oshima Y, Fallon WE, Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975. **66**, S. 731-737.
- [28] Burke JM, Marchisotto J, McLaughlin JJA, Provasoli L, 1960. Analysis of the toxin produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960. **90**, S. 837-842.
- [29] Climiniello P, Fattorusso E, Forino M, Montresor M, Saxitoxin and neosaxitoxin as toxic principles of *Alexandrium andersonii* (Dinophyceae) from the Gulf of Naples, Italy. *Toxicon*, 2000. **38**, S. 1871-877.

- [30] Schantz EJ, Mold JD, Bowden JP, Stanger DW, Maurer JE, Lynch JM, Wyler RS, Riegel B, Sommer H, Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissue. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957. **79**, S. 5230-5235.
- [31] Bordner J, Thiessen WE, Bates HA, Rapoport H, The structure of a crystalline derivate of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1975. **97**, S. 6008-6012.
- [32] Schantz EJ, Ghazarossian VE, Schnoes HK, Strong FM, The structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1975. **97**, S. 1238-1239.
- [33] Schantz EJ, Chemistry and biology of saxitoxins and related toxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986. **47**, 15-23.
- [34] Negri AP, Stirling DJ, Quilliam MA, Blackburn SI, Bolch I, Burton IW, Eaglesham GK, Thomas K, Walter JA, Willis R, Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicol.*, 2003. **16**, S. 1029-1033.
- [35] Sullivan JJ, Iwaoka WT, Liston J, Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam. *BBRC*, 1983. **114**, S. 465-472.
- [36] Artigas ML, Vale PJV, Gomes SS, Botelho MJ, Rodrigues SM, Amorim A, Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity. *J. Chrom. A*, 2007. **1160**, S. 99-105.
- [37] Rogers RS, Rapoport H, The pKa's of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980. **102**, S. 7335-7339.
- [38] Dell' Aversano C, Walter JA, Burton IW, Stirling DJ, Fattorusso E, Quilliam MA, Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels. *J.Nat. Prod.*, 2008. **71**, S. 1518-1523.
- [39] Oshima Y, Chemical and enzymatic transformation of paralytic shefflish toxins in marine organisms. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (Eds.) Harmful marine algal blooms. Lavoisier Science Publishers, Paris, 1995. S. 475-480.
- [40] Kotaki Y, Oshima Y, Yasumoto T, Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins. In: Anderson, DM, White, AW, Baden, DG (Eds.), Toxic dinoflagellates. Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1985. S. 287-292.
- [41] Smith EA, Grant F, Ferguson CMJ, Gallacher S, Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001. **67**, S. 2345-2353.
- [42] Sato S, Kodama M, Chemical and biological transformation of paralytic shellfish poisoning toxins. In: Fingerman M, Nagabhushaman R (Eds.), Recent advances in marine biotechnology 8. Bioremediation, Science Publisher, Enfield, NH, USA, 2003. S. 319-335.
- [43] Buzy A, Thibault P, Laycock MV, Development of a capillary electrophoresis method for the characterization of enzymatic products arising from the carbamoylase digestion of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Chrom. A*, 1994. **688**, S. 301-316.
- [44] Bricelj VM, Cembella AD, Fate of gonyautoxins in surfclams, *Spisula solidissima*, grazing upon toxigenic *Alexandrium*. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (Eds.), Harmful marine algal blooms. Lavoisier Science Publishers, Paris, 1995. S. 413-418.

- [45] Kao CY, Nishiyama A, Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J. Physiol.*, 1965. **180**, S. 50-66.
- [46] Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF, Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.*, 1998. **508**, S. 647-657.
- [47] Kao CY, New perspectives on the interactions of tetrodotoxin and saxitoxin with excitable membranes, *Toxicon*, 1983. **21**, S. 211-219.
- [48] Strichartz G, Structural determinants of the affinity of saxitoxin for neuronal sodium channels. Electrophysiological studies on frog peripheral nerve. *J. Gen. Physiol.*, 1984. **84**, S. 281-305.
- [49] Wright JLC, Dealing with seafood toxins - present approaches and future-options. *Food Res. Int.*, 1995. **28**, S. 347-358.
- [50] Lagos NW, Adrinolo D, Paralytic shellfish poisoning (PSP): toxicology and kinetics. In: Botana LM (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2000. S. 203-215.
- [51] FAO/IOC/WHO, Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, Sept. 2004. S. 26-30.
- [52] van Egmond HP, Speyers GJA, van den Top HJ, Current situation on worldwide regulations for marine phycotoxins. *J. Nat. Toxins*, 1992. **1**, 67-85.
- [53] van Egmond HP, Aune T, Lassus P, Speijers GJA, Waldock M, Paralytic and diarrhetic shellfish poison: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat Toxins*, 1993. **2**, S. 41-83.
- [54] Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.
- [54] Hollingworth T, Wekell M, Fish and other marine products 959.08. Paralytic shellfish poisoning. Biological method. Final Action. In: Hellrich K (Ed.), *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, Virginia, USA, 1990. S. 882-882.
- [56] Hummert C, Ritscher M, Reinhardt K, Luckas B, Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*, 1997. **45**, S. 312-316.
- [57] Mosher HS, Fuhrmann FA, Buchwald HD, Fischer HG, Tarichatoxin-tetrodotoxin: a potent neurotoxin. *Science*, 1964. **144**, S. 1100-1110.
- [58] Noguchi T, Arakawa O, Daigo K, Hashimoto K, Local differences in toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa. *Toxicon*, 1986. **24**, S. 705-711.
- [59] Noguchi T, Jeon JK, Arakawa O, Sugita H, Deguchi Y, Shida Y, Hashimoto K, Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus*. *J. Biochem.*, 1986. **99**, S. 311-314.
- [60] Noguchi T, Hwang DF, Arakawa O, Sugita H, Deguchi Y, Shida Y, Hashimoto K, *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar. Biol.*, 1987. **94**, S. 625-630.

- [61] Narita H, Matsubara S, Miwa N, Akahane S, Murakami M, Goto T, Nara M, Noguchi T, Saito T, Shida Y, Hashimoto K, *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987. **53**, S. 617-621.
- [62] Lee MJ, Jeong DY, Kim WS, Kim HD, Kim CH, Park WW, Park YH, Kim KS, Kim HM, Kim DS, A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiates*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000. **66**, S. 1698-1701.
- [63] Yasumoto T, Yasumura D, Yotsu M, Michishita T, Endo A, Kotaki Y, Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. *Agric. Biol. Chem.*, 1986. **50**, S. 793-795.
- [64] Yotsu M, Yamazaki T, Meguro Y, Endo A, Murata M, Naoki H, Yasumoto T, Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish. *Toxicon*, 1987. **25**, S. 225-228.
- [65] Hwang DF, Arakawa O, Saito T, Noguchi T, Simidu U, Tsukamoto K, Shida Y, Hashimoto K, Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus*. *Mar. Biol.*, 1989. **100**, S. 327-332.
- [66] Yu CF, Yu PHF, Chan PL, Yan Q, Wong PK, Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes. *Toxicon*, 2004. **44**, S. 641-647.
- [67] Noguchi T, Arakawa O, Takatani T, TTX accumulation in pufferfish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D*, 2006. **1**, S. 145-152.
- [68] Noguchi T, Food chain associated toxification of tetrodotoxin-bearing animals. In: Hashimoto K (Ed.), Recent advances in tetrodotoxin research. Kosheida-Koseikaku, Tokio, 1988. S. 85-93.
- [69] Fuhrmann FA, Tetrodotoxin, tarichatoxin, and chiriquitoxin: historical perspectives, In: Tetrodotoxin, saxitoxin, Mol. Biol. Sodium Channel, Annals of the New York Academy of Sciences, 1986. S. 1-14.
- [70] Noguchi T, Arakawa O, Tetrodotoxin – distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar. Drugs*, 2008. **6**, S. 220-242.
- [71] Tsai YH, Ho PH, Hwang CC, Cheng CA, Fwu DF, Tetrodotoxin in several species of xanthid crabs in southern Taiwan. *Food Chem.*, 2006. **95**, S. 205-212.
- [72] Huang HN, Lin J, Lin HL, Identification and quantification of tetrodotoxin in the marine gastropod *Nassarius* by LC–MS. *Toxicon*, 2008. **51**, S. 774-779.
- [73] Yotsu-Yamashita M, Mebs D, Flachsenberger W, Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). *Toxicon*, 2007. **49**, S. 410-412.
- [74] Rodriguez P, Alfonso A, Vale C, Alfonso C, Vale P, Tellez A, Botana LM, First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-TrideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Anal. Chem.*, 2008. **80**, S. 5622-5629.
- [75] Matsui T, Sato H, Hamada S, Shimizu C, Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer fish *Fugu niphobles*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1982. S. 48, 252.
- [76] Mahmud Y, Tanu MB, Takatani B, Asayama E, Arakawa O, Noguchi T, *Celonodon patoca*, a highly toxic marine puffer in Japan. *J. Nat. Toxins*, 2001. **10**, S. 60-74.
- [77] Mahmud Y, Yamamori K, Noguchi T, Occurrence of TTX in a brackishwater puffer “midorifugu” *Tetraodon nigroviridis*, collected from Thailand. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 1999. **40**, S. 363-367.



- [78] Mahmud Y, Yamamori K, Noguchi T, Toxicity and tetrodotoxin as the toxic principle of a brackishwater puffer *Tetraodon steindachneri*, collected from Thailand. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 1999. **40**, S. 391-395.
- [79] Zaman L, Arakawa O, Shimosua A, Onoue Y, Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. *Toxicon*, 1997. **35**, S. 423-431.
- [80] Kungsuwan A, Arakawa O, Promdet M, Onoue Y, Occurrence of paralytic shellfish poisons in thai freshwater puffers. *Toxicon*, 1997. **35**, S. 1341-1346.
- [81] Hwang D-F, Noguchi T, Tetrodotoxin poisoning. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2007. **52**, S. 141-236.
- [82] Nakamura M, Oshima Y, Yasumoto T, Occurrence of saxitoxin in puffer fish. *Toxicon*, 1984. **22**, S. 381-385.
- [83] Kodama M, Ogata T, Nogushi T, Maruyama J, Hashimoto K, Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish *Takifugu pardalis*. *Toxicon*, 1983. **21**, S. 897-900.
- [84] Nakashima K, Arakawa O, Taniyama S, Nonaka M, Tomohiro T, Yamamori K, Fuchi Y, Noguchi T, Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon*, 2004. **43**, S. 207-212.
- [85] Sato S, Ogata T, Borja V, Gonzales C, Fukuyo Y, Kodama M, Frequent occurrence of paralytic shellfish poisoning toxins as dominant toxins in marine puffer from tropical water. *Toxicon*, 2000. **38**, S. 1101-1109.
- [86] Sato S, Kodama M, Ogata T, Saitanu K, Furuya M, Hirayama K, Kakinuma K, Saxitoxin as a toxic principle of a freshwater puffer, *Tetraodon fangi*, in Thailand. *Toxicon*, 1997. **35**, S. 137-140.
- [87] Ngy L, Tada K, Yu C-F, Takatani T, Arakawa O, Occurrence of paralytic shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: Selective toxin accumulation in the skin. *Toxicon*, 2008. **51**, S. 280-288.
- [88] Jang J, Yotsu-Yamashita M, Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. *Toxicon*, 2006. **48**, S. 980-987.
- [89] Horie M, Kobayashi S, Shimizu N, Nakazama H, Determination of tetrodotoxin in puffer-fish by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *The Analyst*, 2002. **127**, S. 755-759.
- [90] Woodward RB, The structure of tetrodotoxin. *Pure Appl.Chem.*, 1964. **9**, S. 49-74.
- [91] Tsuda K, Ikuma S, Kawamura M, Tachikawa R, Sakai K, Tamura C, Amakasu D, Tetrodotoxin. VII. On the structures of tetrodotoxin and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 1964. **12**, S. 1357-1374.
- [92] Goto T, Kishi Y, Takahashi S, Hirata Y, Tetrodotoxin. *Tetrahedron*, 1965. **21**, S. 2059-2088.
- [93] Kishi Y, Fukuyama T, Aratani M, Nakatsubo F, Goto T, Inoue S, Tanino H, Sugiura S, Kakois H, Synthetic studies on tetrodotoxin and related compounds. IV. Stereospecific total syntheses of DL-tetrodotoxin. *J. AOAC Int.*, 1972. **94**, S. 9219-9221.
- [94] Nakamura M, Yasumoto T, Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon*, 1985. **23**, S. 271-276.

- [95] Yasumoto T, Yotsu M, Murata M, Naoki H, New tetrodotoxin analogues from the newt *Cynops ensicauda*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988. **110**, S. 2344-2345.
- [96] Endo A, Khora SS, Murata M, Yasumoto T, Isolation of 11-nortetrodotoxin-6(R)-ol and other tetrodotoxin derivatives from the puffer *Fugu niphobles*. *Tetrahedron Lett.*, 1988. **29**, S. 4127-4128.
- [97] Yotsu M, Hayashi Y, Khora SS, Sato S, Yasumoto T, Isolation and structural assignment of 11-nortetrodotoxin-6(S)-ol from the puffer *Arothron nogropunctatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992. **56**, S. 370-371.
- [98] Yotsu-Yamashita M, Schimmele B, Yasumoto T, Isolation and structural assignment of 5-deoxytetrodotoxin from the puffer fish *Fugu poecilonotus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999. **63**, S. 961-963.
- [99] Yotsu-Yamashita M, Yamagichi Y, Yasumoto T, 5,6,11-trideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *fugu poecilonotus*. *Tetrahedron Lett.*, 1995. **36**, S. 9329-9332.
- [100] Yotsu-Yamashita M, Goto A, Nakagawa T, Isolation of 4-S-cysteinyltetrodotoxin from the liver of the puffer fish *Fugu pardialis*, and formation of the adducts of 4,9-anhydrotetrodotoxins with thiols. *Chem. Res. Toxicol.*, 2005. **18**, S. 865-871.
- [101] Noguchi T, Ebesu JSM, Puffer poisoning: epidemiology and treatment. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 2001. **20**, S. 1-10.
- [102] Kan SK, David P, Chan MK, Nine fatal cases of puffer fish poisoning in Sabah, Malaysia. *Med. J. Malaysia*, 1987. **42**, S. 199-200.
- [103] Lau FL, Wong CK, Yip SH, Puffer fish poisoning. *J. Acid Emerg. Med.*, 1995. **12**, S. 214-215.
- [104] Chew SK, Goh CH, Wang KW, Mah PK, Tan BY, Puffer fish (tetrodotoxin) poisoning: clinical report and role of anti-cholinesterase drugs in therapy. *Singapore Med. J.*, 1983. **24**, S. 168-171.
- [105] Tibballs J, Severe tetrodotoxic fish poisoning. *Anaesth. Intensive Care*, 1988. **16**, S. 215-217.
- [106] Laobhripatr S, Limpakarnjanarat K, Sangwonloy O, Sudhasaneya S, Anuchatvorakul B, Leelasitorn S, Saitanu K, Food poisoning due to consumption of the freshwater puffer *Tetraodon fangi* in Thailand. *Toxicon*, 1990. **28**, S. 1372-1375.
- [107] Mahmud Y, Tanu MB, Noguchi T, First occurrence of a food poisoning incident due to ingestion of *Takifugu oblongus*, along with a toxicological report on three marine puffer species in Bangladesh. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 1999. **40**, S. 473-480.
- [108] Nuñez-Vázquez EJ, Yotsu-Yamashita M, Sierra-Beltrán AP, Yasumoto T, Ochoa JL, Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissues of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Toxicon*, 2000. **38**, S. 729-734.
- [109] Ebesu JSM, Hokama Y, Noguchi T, Tetrodotoxin. In: Hui YH, Kitts D, Stanfield PS (Eds.), Foodborne disease handbook. Marcel Dekker, New York, USA, Vol. 2, 2000. S. 274-276.
- [110] Mosher H, The chemistry of tetrodotoxin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986. **479**, S. 32-43.
- [111] Kao CY, Structure-activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin, and analogues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1986. **479**, S. 52-67.
- [112] Narahashi T, Pharmacology of tetrodotoxin. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 2001. **20**, S. 67-84.

- [113] Kaneko Y, Matsumoto G, Hanyu Y, TTX resistivity of Na<sup>+</sup> channel in newt retinal neuron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997: **240**, S. 651-656.
- [114] Venkatesh B, Lu SQ, Dandona N, See SL, Benner S, Soong TW, Genetic basis of tetrodotoxin resistance in pufferfishes. *Current Biol.*, 2005. **15**, S. 2069-2072.
- [115] Maruta S, Yamaoka K, Yotsu-Yamashita M, Two critical residues in p-loop regions of puffer fish Na<sup>+</sup> channels on TTX-sensitivity. *Toxicon*, 2008. **51**, S. 381-387.
- [116] AOAC International, official method 959.08. In: Horwitz W (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed.), AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000.
- [117] Sullivan JJ, Wekell MM, Kentala LL, Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish. *J. Food Sci.*, 1985. **50**, S. 26-29.
- [118] Kawabata T, Assay method for tetrodotoxin,. In Food hygiene examination manual, Vol. 2. Japan Food Hygiene Association, Tokio, 1978., S. 232–240.
- [119] Yasumoto Y, Tetrodotoxin. In: Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare (Ed.), Standard methods of analysis in food safety regulation-chemistry. Japan Food Hygiene Association, Tokio, 1991. S. 296–300.
- [120] Cammann K, Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendung und Qualitätssicherung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2001.
- [121] Szabo AG, Fluorescence principles and measurement. In: Gore MM (Ed.), Spectrophotometry & spectrofluorimetry. Oxford University Press, 2000. S. 33-67.
- [122] Böcker J, Chromatographie- Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese. 1. Auflage, Vogel Buchverlag, Würzburg, 1999. S. 27-46.
- [123] Bates HA, Rapoport H, A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. Agric. Food Chem.*, 1975. **23**, S. 237-239.
- [124] Bates HA, Kostriken R, Rapoport H, A chemical assay for saxitoxins. Improvements and modifications. *J. Agric. Food Chem.*, 1975. **26**, S. 252-254.
- [125] Quilliam MA, Janecek M, Lawrence JF, Characterization of the oxidation products of paralytic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rap. Comm. Mass Spectrom.*, 1993. **7**, S. 482-487.
- [126] Lawrence JF, Menard C, Charbonneau CF, Hall S, A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poisoning using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, 1991. **74**, S. 404-409.
- [127] Luckas B, Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *J. Chrom.*, 1992. **624**, S. 439-456.
- [128] Nuñez MT, Fischer S, Jaimovich E, A fluorimetric method to determine tetrodotoxin. *Anal. Biochem.*, 1976. **72**, S. 320-325.
- [129] Budzikiewicz H, Massenspektrometrie- eine Einführung. 4. Auflage, WILEY-VHC-Verlag, Weinheim, 1998.
- [130] Lehmann WD, Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
- [131] Schröder E, Massenspektrometrie- Begriffe und Definitionen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1991.

- [132] Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, 2005. **88**, S. 1714-1732.
- [133] Sullivan JJ, Wekell MM, Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-pressure liquid-chromatography. *ACS Symp. Ser.*, 1984. **262**, S. 197-205.
- [134] Thielert G, Kaiser I, Luckas B, HPLC determination of PSP toxins. In: Freymy JM (Ed.), Proceedings of symposium on marine biotoxins, Editions CNEVA, Maisons-Alfort, 1991. S. 121-125.
- [135] Oshima Y, Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, 1995. **78**, S. 528-532.
- [136] Diener M, Erler K, Hiller S, Christian B, Luckas B, Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006. **224**, S. 147-151.
- [137] Quilliam MA, The role of chromatography in the hunt for red tides toxins. *J. Chrom. A*, 2003. **1000**, S. 527-548.
- [138] Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam MA, Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J. Chrom. A*, 2005. **1081**, S. 190-201.
- [139] Jaime E, Hummert C, Hess P, Luckas B, Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chrom. A*, 2001. **929**, S. 43-49.
- [140] Diener M, Erler K, Christian B, Luckas B, Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Sep. Sci.*, 2007. **30**, S. 1821-1826.
- [141] Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA, Analysis of cyanobacterial toxins by previous hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 2004. **1028**, S. 155-164.
- [142] Yasumoto T, Michishita T, Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 1985. **49**, S. 3077-3080.
- [143] Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T, Yasumoto T, Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 2001. **290**, S. 10-17.
- [144] Nagashima Y, Maruyama J, Noguchi T, Hashimoto K, Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987. **53**, S. 819-823.
- [145] Nakagawa T, Jang J, Yotsu-Yamashita M, Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs. *Anal. Biochem.*, 2006. **352**, S. 142-144.
- [146] Diener M, Christian B, Ahmed MS, Luckas B, Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu oblongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007. **389**, S. 1997-2002.
- [147] Guillard RRL, Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (Eds.), Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York, USA, 1975. S. 26-60.

- [148] Shumway SE, van Egmond HP, Hurst JW, Bean LL, Management of shellfish resources. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Eds.), Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and Guides 33, UNESCO, Paris, 1995. S. 433-459.
- [149] Bricelj VM, Shumway SE, Paralytic Shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.*, 1998. **6**, S. 315-383.
- [150] Jaime E, Gerdtz G, Luckas B, In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae*, 2007. **6**, S. 308-316.
- [151] Blanco J, Reyero MI, Franco J, Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 2003. **42**, S. 777-784.
- [152] Lassus P, Fremy JM, Ledoux M, Bardouil M, Bohec M, Patterns of experimental contamination by *Protogonyaulax tamarensis* in some French commercial shellfish. *Toxicon* 1989, **27**, S. 1313-1321.
- [153] Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR, Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (Blue-Green-Alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water-supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. **50**, S. 1292-1295.
- [154] Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, Noparatnaraporn N, Yongmanitchai W, Kaya K, Watanabe MM, Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*, 2001. **39**, S. 973-980.
- [155] Molica R, Onodera H, Garcia C, Rivas M, Adrinolo D, Nascimento S, Meguro H, Oshima Y, Azevedo S, Lagos N, Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxins analogue. *Phycologia*, 2002. **41**, S. 606-611.
- [156] Lagos N, Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.*, 1998. **31**, S. 375-386.
- [157] Diener M, Entwicklung von chromatographischen Analyseverfahren zur Bestimmung von Neurotoxinen aus Lebensmitteln mariner Herkunft. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2008.

## **7 ANHANG**

### **7.1 Geräte**

#### **HPLC-Anlagen**

**1. HPLC-Anlage der Firma Shimadzu (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)**

SIL-10A Autosampler (Shimadzu)  
quarternäre LC-10ATvp Pumpe (Shimadzu)  
SCL-10A Systemcontroller (Shimadzu)  
CTO-10AC Säulenofen (Shimadzu)  
RF-10Axi Fluoreszenzdetektor (Shimadzu)  
CRX390-Reaktionseinheit (Pickering Laboratories, Mountain View, USA) mit  
TFE-Reaktionsschleife (15 m x 0,3 mm)  
zwei LC-9A Pumpen (Shimadzu)  
Auswertungssoftware: Class-vp 4.3

**2. HPLC-Anlage der Firma JASCO (JASCO, Groß-Umstadt, Deutschland)**

AS 950 Autosampler (JASCO)  
tertiäre PU 980 Pumpe (JASCO)  
LC-Net II/ADC Systemcontroller (JASCO)  
FP 920 Fluoreszenzdetektor (JASCO)  
CTO-10AC Säulenofen (Shimadzu)  
CRX400-Reaktionseinheit (Pickering Laboratories, Mountain View, USA) mit  
TFE-Reaktionsschleife (15 m x 0,3 mm)  
zwei LC-9A Pumpen (Shimadzu)

**3. HPLC-Anlage der Firma Shimadzu (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)**

SIL-10ADvp Autosampler  
zwei LC-10AT Pumpen  
SCL-10Avp Systemcontroller  
CTO-10AT Säulenofen

4. HPLC-Anlage der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Serie 1100:

G1313A Autosampler

G1312A binäre Pumpe

G1322A Entgaser

G1316A Säulenofen

5. HPLC-Anlage der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Serie 1100:

G1329A Autosampler

G1311A binäre Pumpe

G1379A Entgaser

G1316A Säulenofen

6. HPLC-Anlage der Firma Dionex (Dionex, Idstein, Deutschland)

Dionex UltiMate 3000

## **LC-MS System**

API 165 der Firma Applied Biosystems (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)

Single-Quadrupol-Massenspektrometer

Turbo-Ionenspray-Quelle (ESI)

verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland); (4.)

Auswertungssoftware: Analyst Software Version 1.4.2 (Applied Biosystems)

## **LC-MS/MS Systeme**

1. API 365 der Firma Applied Biosystems (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)

Single-Quadrupol-Massenspektrometer

Turbo-Ionenspray-Quelle (ESI)

verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Shimadzu (Shimadzu, Duisburg, Deutschland); (3.)

Auswertungssoftware: Analyst Software Version 1.4.2 (Applied Biosystems)

2. Sciex 4000 Q Trap (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)  
Triple-Quadrupol-Massenspektrometer; Q3 als Quadrupol oder LIT einsetzbar  
Turbo-Ionenspray-Quelle (ESI)  
verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland); (5.)  
Auswertungssoftware: Analyst Software Version 1.4.2 (Applied Biosystems)
3. LTQ Orbitrap FTMS (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)  
Hybridmassenspektrometer aus einer linearen Ionenfalle und einem Orbitrap-Analysator  
verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Dionex (Dionex, Idstein, Deutschland); (6.)

### **Analytische Trennsäulen**

1. ZIC-HILIC 5  $\mu\text{m}$  200Å (250 mm x 4,6 mm), dichrom GmbH (Marl, Deutschland)
2. ZIC-HILIC 5  $\mu\text{m}$  200Å (150 mm x 2,1 mm), dichrom GmbH (Marl, Deutschland)
3. Luna C18 (2) 5  $\mu\text{m}$  ,100Å (250 mm x 4,6 mm), Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
4. Symmetry C18 Säule 3,5  $\mu\text{m}$ , 100Å (100 x 2,1 mm), Waters GmbH (Eschborn, Deutschland)

### **Geräte zur Probenaufarbeitung**

- Analysenwaage Sartorius CP225D (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Analysenwaage Scaltec SBC31 (Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Deutschland)
- Analysewaage Atilon ALT-224 (Acculab Sartorius Group, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Autoklav Varioklav 135S Dampfsterilisator (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland)
- Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)



- Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland)
- Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2, Finn-Aqua ( Kroll Laborbedarf, Hamburg, Deutschland)
- Heraeus Multifuge 1 S-R (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
- Kerzenfilterapparatur, Porengröße 10 µm, 3 µm (Wolftechnik Filtersysteme GmbH, Weil der Stadt, Deutschland)
- Metallblock-Thermostat Dri-Block DB 2A (Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland)
- Mikroliterzentrifuge Z 200 M/H (Hermle Labortechnik GmbH, Wehningen, Deutschland)
- Rotationsverdampfer Büchi 001 Rotavapor EL 131 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz)
- Sauerstoff- und Temperaturmessgerät OxyScan Graphic (UMS GmbH & Co. KG, Meiningen)
- Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex Super RK 514 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Ultraschallstab Sonoplus GM70 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Ultrazentrifuge Z200MH (Hermle Labortechnik GmbH, Wehningen, Deutschland)
- Zentrifuge Biofuge 15 (Heraeus Sepatech, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- Zentrifuge Sorvall RC-5B Superspeed, Du Pont Instruments, Bad Nauheim, Deutschland)

## 7.2 Standardsubstanzen

PSP-Toxine:	GTX1-4, dcGTX2/3, Neo, STX, dcSTX, C1/2, B1 (vom National Research Council Canada, Institute for Marine Biosciences, Halifax, Kanada)
Tetrodotoxin:	TTX (von Alexis, Lausen, Schweiz) enthält in geringen Konzentrationen AnhydroTTX und 11-DeoxyTTX

### 7.3 Verwendetes Probenmaterial

#### Probenmaterial des Akkumulations- und Metabolisierungsversuches:

*Alexandrium ostenfeldii* (Strain AOTV-A4)

*Alexandrium minutum* (Strain CCMP-113)

*Mytilus edulis*

#### *Cylindospermopsis raciborskii*:

Strain ITEP-018

Strain ITEP-028

Strain ITEP-A1

Strain Jucaz

Strain PMC 00.01

#### Kugelfische:

Spezies	Herkunft	Probennummer	Gewebe
<i>Lagocephalus wheelerie</i>	<u>Malaysia</u>	360908-1a	Magen
		360908-1b	Muskel
		360908-2a	Muskel
		360908-2b	Haut
		360908-2c	Gonaden
		360908-3a	Muskel
unbekannt	<u>Vietnam</u> Phan Thiet	601107-1	gesamter Fischkörper
		601107-2	gesamter Fischkörper
	Vung Tau		
<i>Takifugu poecilonotus</i>	<u>Japan</u> Bucht von Osaka	2106.10-1	Haut
		2106.10-2	Haut
unbekannt	Küstenregion der Präfektur Wakayama	3822.00-1a	Haut
		3822.00-1b	Muskel
		3822.00-1c	Darm
		3822.00-2a	Haut
		3822.00-2b	Muskel
		3822.00-2c	Darm

## 7.4 Chemikalien

Acetonitril:	HPLC grade ACROS Organics, Geel, Belgien Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Ameisensäure:	99 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Ammoniumformiat:	≥ 95 % Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumphosphat:	98 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Essigsäure:	Eisessig 100 % VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Heptansulfonsäure:	Na-Salz-Monohydrat, HPLC grade ACROS Organics, Geel, Belgien
Methanol:	HPLC grade VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Natriumacetat:	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Natriumazid:	99 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Oktansulfonsäure:	Na-Salz-Monohydrat, 98 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Periodsäure:	zur Synthese Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure:	25 % Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure:	65 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Tetrahydrofuran:	für die Flüssigkeitschromatographie VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Wasser:	MilliQ RG Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland

## 7.5 Tabellen

**Tab. 25: Sauerstoffgehalt in den Becken und im Tank während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase**

Proben- entnahmetag (d)	Sauerstoffkonzentration (mg L <sup>-1</sup> )			SD (mg L <sup>-1</sup> )		
	Becken A AOTV-A4	Becken B CCMP-113	Tank Kontrollen	Becken A AOTV-A4	Becken B CCMP-113	Tank Kontrollen
2	9,27	9,38	8,63	0,12	0,09	0,09
4	9,54	9,28	8,84	0,31	0,19	0,10
6	9,57	9,42	8,94	0,49	0,32	0,09
8	9,54	9,67	8,83	0,19	0,04	0,11
10	10,35	10,48	9,60	0,20	0,13	0,21
12	9,95	9,94	9,38	0,08	0,08	0,07
14	9,60	9,88	10,32	0,03	0,10	0,17
16	10,60	11,10	10,66	0,10	0,39	0,09
18	10,57	10,71	10,36	0,23	0,05	0,12
20	10,26	10,17	10,34	0,11	0,10	0,02
22	9,93	9,93	10,02	0,07	0,11	0,13
24	10,80	10,68	10,55	0,04	0,18	0,05
26	10,16	10,21	10,57	0,10	0,27	0,05

**Tab. 26: Temperatur in den Becken und im Tank während der Intoxikations- und Detoxifikationsphase**

Proben- entnahmetag (d)	Temperatur (°C)			SD (°C)		
	Becken A AOTV-A4	Becken B CCMP-113	Tank Kontrollen	Becken A AOTV-A4	Becken B CCMP-113	Tank Kontrollen
2	9,27	9,38	8,63	0,12	0,09	0,09
4	9,54	9,28	8,84	0,31	0,19	0,10
6	9,57	9,42	8,94	0,49	0,32	0,09
8	9,54	9,67	8,83	0,19	0,04	0,11
10	10,35	10,48	9,60	0,20	0,13	0,21
12	9,95	9,94	9,38	0,08	0,08	0,07
14	9,60	9,88	10,32	0,03	0,10	0,17
16	10,60	11,10	10,66	0,10	0,39	0,09
18	10,57	10,71	10,36	0,23	0,05	0,12
20	10,26	10,17	10,34	0,11	0,10	0,02
22	10,02	9,93	10,02	0,07	0,11	0,13
24	10,80	10,68	10,55	0,04	0,18	0,05

Tab. 27: PSP-Toxinkonzentrationen in der Kultur AOTV-A4

Probenentnahmetag (d)	Probe Nr.	Konzentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ Kultur)			Konzentration (%)		
		GTX2	GTX3	STX	GTX2	GTX3	STX
0	1	0,45	3,76	0,38	9,90	81,90	8,20
2	2	0,43	3,09	0,30	11,20	81,00	7,90
4	3	0,62	6,31	0,56	8,20	84,30	7,50
6	4	1,00	10,72	0,86	8,00	85,20	6,80
8	5	0,84	10,21	0,84	7,10	85,90	7,10
10	6	1,14	17,25	1,35	5,80	87,40	6,80
12	7	1,25	16,09	1,01	6,80	87,70	5,50

Tab. 28: PSP-Toxinkonzentrationen in der Kultur CCMP-113

Probenentnahmetag (d)	Probe Nr.	Konzentration ( $\mu\text{g L Kultur}^{-1}$ )				Konzentration (%)			
		GTX4	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3
0	8	16,35	6,50	0,42	0,32	69,31	27,55	1,77	1,37
2	9	19,14	6,97	0,42	0,61	70,52	25,67	1,56	2,26
4	10	7,32	2,85	0,16	0,09	70,24	27,32	1,58	0,86
6	11	7,54	2,62	0,14	0,12	72,38	25,18	1,33	1,12
8	12	13,50	5,34	0,35	0,34	69,14	27,32	1,80	1,74
10	13	9,76	4,92	0,34	0,26	63,90	32,23	2,20	1,68
12	14	6,91	4,45	0,35	0,23	57,89	37,31	2,90	1,89

Tab. 29: Abmessungen und Gewichte von *M. edulis* während der Intoxikationsphase

Probenentnahmetag (d)		2	4	6	8	10	12	14
<i>M. edulis</i> AOTV-A4	Länge (cm)	4,1	3,8	4,0	4,0	3,7	3,9	3,9
	Breite (cm)	2,2	2,0	2,1	2,1	2,0	2,0	2,1
	Nassgewicht (g)	17,6	13,9	17,3	17,9	14,2	18,3	18,1
	Trockengewicht (g)	2,6	2,2	2,5	2,8	1,9	2,5	2,6
<i>M. edulis</i> CCMP-113	Länge (cm)	4,1	4,0	3,9	4,1	3,9	3,5	3,8
	Breite (cm)	2,1	2,1	2,1	2,2	2,0	1,9	2,0
	Nassgewicht (g)	16,4	14,8	16,1	20,3	17,8	12,5	17,6
	Trockengewicht (g)	2,3	2,3	2,3	3,1	2,5	1,7	2,5
Kontroll- muscheln	Länge (cm)	4,0	3,8	4,0	3,9	4,0	3,9	4,0
	Breite (cm)	2,2	2,1	2,2	2,1	2,1	2,0	2,0
	Nassgewicht (g)	15,2	13,8	17,8	16,1	19,0	17,7	18,0
	Trockengewicht (g)	2,5	2,1	2,6	2,2	2,6	2,4	2,5

**Tab. 30: Abmessungen und Gewichte von *M. edulis* während der Detoxifikationsphase**

Probenentnahmetag (d)		16	18	20	22	24	26	28
<i>M. edulis</i> AOTV-A4	Länge (cm)	4,0	4,1	3,8	4,0	3,9	3,9	4,1
	Breite (cm)	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,0	2,1
	Nassgewicht (g)	18,6	19,6	17,0	20,1	18,9	18,7	18,7
	Trockengewicht (g)	2,6	2,7	2,3	2,7	2,5	2,5	2,5
<i>M. edulis</i> CCMP-113	Länge (cm)	4,0	4,0	4,0	4,1	3,9	3,9	4,1
	Breite (cm)	2,1	2,1	2,2	2,1	2,1	2,1	2,2
	Nassgewicht (g)	17,3	17,3	18,9	19,8	19,4	19,1	20,5
	Trockengewicht (g)	2,6	2,5	2,6	2,6	2,7	2,6	2,8
Kontroll- muscheln	Länge (cm)	4,0	4,2	4,1	4,0	4,1	3,9	4,0
	Breite (cm)	2,1	2,2	2,2	2,2	2,2	2,1	2,2
	Nassgewicht (g)	17,7	22,9	21,9	21,5	22,6	20,6	20,4
	Trockengewicht (g)	2,5	3,1	2,8	2,9	3,0	2,5	2,7

**Tab. 31: PSP-Toxinkonzentrationen in *M. edulis* während der Intoxikation mit AOTV-A4 und der Detoxifikation\***

Probenent- nahmetag (d)	Konzentration (ng g <sup>-1</sup> NG)			SD (ng g <sup>-1</sup> NG)		
	GTX2	GTX3	STX	GTX2	GTX3	STX
2	30,92	50,79	9,92	0,96	2,36	0,05
4	36,37	60,88	11,39	0,63	0,84	0,20
6	30,89	40,11	9,14	0,76	1,59	0,40
8	94,77	151,18	16,71	5,68	6,33	1,21
10	99,31	146,54	17,68	8,70	6,29	0,64
12	123,10	162,01	19,37	4,90	3,21	0,28
14	145,92	188,52	22,31	6,18	6,31	0,47
16	133,31	129,20	19,05	0,77	1,24	0,35
18	168,98	153,02	18,35	3,27	1,93	3,11
20	94,69	109,68	16,99	9,61	6,28	1,60
22	129,88	125,29	18,56	5,00	4,43	0,63
24	77,53	69,11	12,49	0,99	0,24	0,60
26	105,46	83,02	15,34	3,13	2,15	0,98
28	93,40	59,46	12,31	4,37	3,11	0,87

\*Mittelwerte

Tab. 32: Prozentuale Verteilung der PSP-Toxine in *M. edulis* während der Intoxikation mit AOTV-A4 und der Detoxifikation\*

Probenent- nahmetag (d)	Konzentration (%)			SD (%)		
	GTX2	GTX3	STX	GTX2	GTX3	STX
2	33,75	55,41	10,84	0,43	0,68	0,38
4	33,48	56,04	10,48	0,09	0,08	0,09
6	38,55	50,04	11,41	0,68	0,48	0,38
8	36,06	57,57	6,38	0,55	0,40	0,54
10	37,62	55,66	6,72	1,07	0,93	0,15
12	40,42	53,22	6,36	0,99	0,87	0,12
14	40,89	52,85	6,26	0,28	0,20	0,10
16	47,35	45,89	6,77	0,16	0,12	0,12
18	49,65	44,96	5,39	1,14	0,36	0,90
20	42,70	49,63	7,67	1,10	1,05	0,33
22	47,44	45,77	6,78	0,48	0,33	0,15
24	48,72	43,44	7,85	0,38	0,36	0,32
26	51,75	40,74	7,52	0,11	0,26	0,26
28	56,55	36,00	7,45	0,17	0,54	0,38

\*Mittelwerte

Tab. 33: PSP-Toxinkonzentrationen in *M. edulis* während der Intoxikation mit CCMP-113 und der Detoxifikation\*

Probenent- nahmetag (d)	Konzentration (ng g <sup>-1</sup> NG)				SD (ng g <sup>-1</sup> NG)			
	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3
2	88,82	521,13	16,38	5,39	10,99	35,62	0,09	0,11
4	192,67	720,59	22,31	8,21	5,74	13,23	0,32	0,16
6	179,43	701,40	24,07	7,65	1,86	21,99	1,06	0,47
8	163,33	650,10	27,37	11,49	12,50	5,67	1,38	1,57
10	160,42	770,75	32,79	9,82	0,62	16,13	0,16	0,05
12	203,92	881,45	45,95	14,48	8,33	51,70	0,68	0,54
14	211,23	911,16	46,07	16,68	31,24	53,71	1,70	2,56
16	163,76	843,19	64,67	21,50	7,40	8,32	1,45	0,83
18	220,03	742,86	65,18	34,22	49,37	40,83	4,43	5,29
20	209,87	823,96	67,16	28,26	3,00	9,36	1,17	0,34
22	200,25	655,23	77,51	38,99	27,58	34,31	2,85	4,99
24	101,62	550,62	84,03	29,27	6,95	18,73	0,72	1,29
26	106,76	607,30	91,25	27,19	16,77	32,77	5,48	2,39
28	143,95	619,43	75,27	29,65	7,33	55,20	2,55	4,88

\*Mittelwerte

**Tab. 34: Prozentuale Verteilung der PSP-Toxine in *M. edulis* während der Intoxikation mit CCMP-113 und der Detoxifikation\***

Probenent- nahmetag (d)	Konzentration (%)				SD (%)			
	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3
2	14,01	82,53	2,61	0,86	0,77	0,54	0,21	0,05
4	20,41	76,35	2,36	0,87	0,21	0,16	0,05	0,01
6	19,67	76,85	2,64	0,84	0,34	0,37	0,05	0,07
8	19,14	76,29	3,21	1,35	1,16	1,10	0,21	0,16
10	16,48	79,15	3,37	1,01	0,32	0,39	0,05	0,02
12	17,81	76,90	4,02	1,27	0,21	0,50	0,19	0,11
14	17,72	76,97	3,91	1,40	1,43	1,18	0,38	0,12
16	14,98	77,14	5,92	1,97	0,64	0,53	0,17	0,06
18	20,46	70,12	6,22	3,20	3,05	2,27	1,00	0,26
20	18,58	72,97	5,95	2,50	0,14	0,16	0,04	0,00
22	20,50	67,47	8,03	4,00	1,63	1,19	0,84	0,29
24	13,26	71,93	10,99	3,82	0,46	0,33	0,43	0,10
26	12,75	73,00	10,98	3,27	1,36	0,78	0,59	0,20
28	16,61	71,25	8,74	3,40	0,53	1,14	0,95	0,37

\*Mittelwerte

**Tab. 35: PSP-Toxinkonzentrationen im Filtrationswasser von *M. edulis* nach Fütterung mit AOTV-A4**

Probenent- nahmetag (d)	ng L <sup>-1</sup>			Konzentration (%)		
	GTX2	GTX3	STX	GTX2	GTX3	STX
2	22,6	97,6	8,6	17,6	75,8	6,6
4	83,4	163,6	7,6	32,8	64,3	3,0
6	176,4	75,6	7,2	68,0	29,2	2,8
8	521,2	383,2	18,0	56,5	41,5	1,9
10	180,0	356,8	13,0	32,8	64,9	2,4
12	385,0	912,4	35,2	28,9	68,5	2,7
14	419,2	1203,4	42,0	25,2	72,3	2,5
16	29,2	83,4	4,0	25,0	71,6	3,4
18	10,2	21,2	2,6	29,8	62,4	7,8
20	6,6	6,0	0,0	52,9	47,1	0,0
22	5,6	2,0	0,0	73,2	26,8	0,0
24	5,0	3,2	0,0	60,6	39,4	0,0
26	5,8	1,8	0,0	75,7	24,3	0,0
28	4,6	1,8	0,0	72,5	27,5	0,0





**Tab. 38: PSP-Toxinkonzentrationen im Exkrement- und Sedimentwasser von *M. edulis* nach Fütterung mit CCMP-113**

Probenent- nahmetag (d)	ng L <sup>-1</sup>				Konzentration (%)			
	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX1	GTX2	GTX3
2	110,2	175,2	19,2	20,4	33,9	53,9	5,9	6,3
4	100,0	192,0	78,4	38,6	24,4	47,0	19,2	9,5
6	62,4	204,4	108,2	50,8	14,7	48,0	25,4	11,9
8	57,4	156,2	21,0	7,8	23,7	64,5	8,7	3,2
10	62,2	191,4	107,2	50,0	15,2	46,6	26,1	12,2
12	125,6	110,4	5,2	3,4	51,3	45,1	2,2	1,4
14	96,0	122,8	9,6	8,6	40,5	51,8	4,0	3,7
16	51,6	111,0	9,0	3,4	29,5	63,4	5,2	2,0
18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tab. 39: Fraktionssammlung zur Gewinnung von U1 aus ITEP-018**

Fraktion	Inj.vol. (µL)	Fraktions- sammlung (min)	HILIC-FD (Area)	ERDI (Area)	Resuspen- sionsvo- lumen (µl)	zusammen- geführte Fraktionen
1	30	32,0-41,0				
2	30	32,0 -41,0	1259210		150	
3	40	32,0 -41,0				
4	40	31,5-39,0	1634930		150	
5	40	31,5-39,0				
6	40	31,5-39,0				
7	40	31,5-39,0	1800383		150	
8	40	31,5-39,0				1-14
9	40	31,5-39,0				
10	40	31,5-39,0	1440546		150	
11	40	31,5-39,0				
12	40	31,5-40,5				
13	40	31,5-40,5	1786226		150	
14	40	31,5-40,5				
15	60	30,0-37,3				
16	60	30,0-37,3	93123		150	
17	60	30,0-37,3				
18	50	30,0 -37,3				15-20
19	50	30,0 -37,3	517788		-	
20	50	30,0 -37,3				

Fortsetzung Tab.39

Fraktion	Inj.vol. (µL)	Fraktions- sammlung (min)	HILIC-FD (Area)	ERDI (Area)	Resuspen- sionsvo- lumen (µl)	zusammen- geführte Fraktionen
21	50	30,0-37,3	468698		-	
22	50	30,0-37,3				
23	50	30,0-37,3	299729		300	21-27
24	50	30,0-37,3				
25	50	29,8-37,0			-	
26	50	29,8-37,0				
27	40	29,8-37,0				
30	40	30,5-36,2	1001484			
31	40	30,5-36,2	925181			
32	40	31,0-38,0	10650		500	30-35
33	40	31,0-38,0	23937			
34	40	31,0-38,0	10092			
35	40	31,0-38,0	22648			
36	40	31,0-37,0	15166			
37	40	31,0-37,0	24149			
38	40	31,0-37,0	34137		500	36-39
39	40	31,0-37,0	39975			
46	40	35,5-41,0		-		
47	40	35,0-41,0		-		
48	40	35,0-41,0		-	500	46-50
49	40	35,0-41,0		-		
50	40	35,0-41,0		-		
51	40	31,0-37,0		46374	250	51, 52, 56, 57
52	40	31,0-37,0		46654		
53	40	31,0-37,0		51011	500	53-55
54	40	31,0-37,0		48208		
55	40	31,0-41,0		35321	250	51, 52, 56, 57
56	40	32,0-36,5		57381		
57	40	30,5-36,5		56128	300	58-59
58	40	30,5-36,5		-		
59	40	30,5-36,5		-		
60	40	30,5-36,5		49488		
61	50	30,0-36,0		13617	500	60-63
62	50	30,0-36,0		65543		
63	50	30,0-36,0		60435		
64	40	32,0-39,0		91826		
65	50	32,0-39,0		87817	500	64-67
66	50	32,0-39,4		-		
67	50	32,9-39,0		-		

Tab. 40: Fraktionssammlung zur Gewinnung von U2 aus ITEP-018 nach saurer Hydrolyse des Extraktes

Fraktion	Inj.vol. (µL)	Fraktions- sammlung (min)	HILIC-FD (Area)	ERDI (Area)	Resuspen- sionsvo- lumen (µl)	zusammen- geführte Fraktionen	
1	50	37,0-44,8	1899874		200	1-4	
2	50	37,0-44,8					
3	50	37,0-44,8					
4	50	37,0-44,8					
5	60	37,3-47,0	-		150	5-10	
6	60	37,3-47,0					
7	60	37,3-47,0					
8	50	37,3-47,0	-		150		
9	50	37,3-47,0					
10	50	37,3-47,0					
11	50	37,5-45,0	-			11-17	
12	50	37,5-45,0					
13	50	37,5-45,0	-		300		
14	50	37,5-45,0					
15	50	37,0-44,5	319662				
16	50	37,0-44,5					
17	40	37,0-44,5					
18	40	33,0-46,0	3279462		300	18-20 + 23-24	
19	40	33,0-46,0					
20	40	33,0-46,0					
21	40	33,0-46,0	2822238		200	21-22	
22	40	33,0-46,0					
23	40	36,0-47,5	2856693		300	18-20 + 23-24	
24	40	36,0-47,5					
25	50	36,0-47,5	4730394		200	25-26	
26	50	36,0-47,5					
30	30	35,0-42,0	3560934				
31	30	35,0-42,0	4445757				
32	30	35,0-42,0	3408576				
33	50	35,0-42,0	4149584				
34	40	36,0-43,0	5664524				
35	40	36,0-43,0	4872591				
36	40	36,0-43,0	5207727				
38	40	39,0-46,5	6092573				
39	40	39,0-46,5	3419081				
40	40	39,0-46,5	3131843				
41	40	39,0-46,5	3337770				

Fortsetzung Tab. 40

Fraktion	Inj.vol. ( $\mu\text{L}$ )	Fraktions- sammlung (min)	HILIC-FD (Area)	ERDI (Area)	Resuspen- sionsvo- lumen ( $\mu\text{L}$ )	zusammen- geführte Fraktionen
42	40	34,0-43,0	3615045			
43	50	34,0-43,0	4069211			
44	50	34,0-43,0	5066102			
45	50	34,0-43,0		3418139	500	42-45
46	50	40,0-47,0		142706		
47	50	40,0-47,0		84011		
48	50	40,0-47,0		105632		
49	50	40,0-47,0		86832		

Tab. 41: Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia (LC-MS-Bestimmung)

Probe	Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
	TTX	4-epi TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	4-epi TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
36 0908-1a	0,91	0,14	0,04	0,00	0,08	0,01	0,004	0,000
36 0908-1b	0,59	0,12	0,03	< LOD	0,01	0,02	0,002	-
36 0908-2a	4,32	0,41	0,00	< LOD	0,11	0,21	0,000	-
36 0908-2b	2,24	0,07	0,00	< LOD	0,14	0,01	0,000	-
36 0908-2c	5,32	0,46	0,09	0,11	0,55	0,32	0,003	0,02
36 0908-3a	5,19	0,53	0,00	< LOD	0,37	0,26	0,000	-
36 0908-3b	0,76	0,25	0,00	< LOD	0,06	0,02	0,000	-

Tab. 42: Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia (LC-MS/MS-Bestimmung)

Probe	Konzentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
	TTX	4-epi TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	4-epi TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
36 0908-1a	0,70	0,12	0,02	0,00	0,13	0,01	0,02	0,004
36 0908-1b	0,53	0,09	0,01	< LOD	0,03	0,01	0,01	-
36 0908-2a	3,56	0,31	0,00	< LOD	0,27	0,03	0,000	-
36 0908-2b	2,03	0,05	0,00	< LOD	0,12	0,02	0,000	-
36 0908-2c	4,51	0,31	0,08	0,03	0,09	0,01	0,02	0,004
36 0908-3a	4,39	0,30	0,00	< LOD	0,18	0,02	0,000	-
36 0908-3b	0,83	0,10	0,00	< LOD	0,04	0,01	0,000	-

Tab. 43: Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die LC-MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia und Vietnam

Toxin	Regressionsgerade		R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)
TTX	y= 7,00E+04	x + 2,58E+04	0,9999	0,42
AnhydroTTX	y= 7,38E+04	x + 3,54E+03	0,9974	0,40
11-DeoxyTTX	y= 7,55E+04	x + 7,08E+02	0,9991	0,37

**Tab. 44: Regressionsgerade und LOD (S/N 3:1) für die LC-MS/MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Malaysia und Vietnam**

Toxin	Regressionsgerade		R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)
TTX	y= 8,91E+03	x - 4,27E+03	0,9923	0,14
AnhydroTTX	y= 9,19E+03	x + 9,53E+01	0,9974	0,16
11-DeoxyTTX	y= 8,81E+03	x - 5,85E+01	0,9965	0,12

**Tab. 45: Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Vietnam (LC-MS-Bestimmung)**

Probe	Konzentration (µg g <sup>-1</sup> )			SD (µg g <sup>-1</sup> )		
	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
601107-1	1,63	0,00	0,29	0,05	0,00	0,01
601107-2	0,30	0,00	0,22	0,05	0,00	0,04

**Tab. 46: Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Vietnam (LC-MS/MS-Bestimmung)**

Probe	Konzentration (µg g <sup>-1</sup> )			SD (µg g <sup>-1</sup> )		
	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
601107-1	1,16	0,00	0,18	0,03	0,00	0,04
601107-2	0,47	0,00	0,22	0,01	0,00	0,02

**Tab. 47: Konzentrationen von TTXs in Kugelfischen aus Japan (LC-MS-Bestimmung)**

Probe	Konzentration (µg g <sup>-1</sup> )			SD (µg g <sup>-1</sup> )		
	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX	TTX	Anhydro TTX	11-Deoxy TTX
2106.10-1	3,54	0,60	0,11	0,16	0,02	0,01
2106.10-2	2,33	0,36	0,11	0,17	0,01	0,00
3822.00-1a	1,81	0,23	0,82	0,04	0,01	0,02
3822.00-1b	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3822.00-1c	0,26	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
3822.00-2a	2,56	0,24	1,35	0,09	0,01	0,17
3822.00-2b	0,15	0,07	0,11	0,01	0,01	0,01
3822.00-2c	0,34	0,00	0,06	0,01	0,00	0,05

**Tab. 48: Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die LC-MS-Bestimmung von TTXs in Kugelfischen aus Japan**

Toxin	Regressionsgerade		R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)
TTX	y= 1,46E+05	x - 1,25E+04	0,9999	0,20
AnhydroTTX	y= 1,56E+05	x - 1,98E+03	0,9999	0,17
11-DeoxyTTX	y= 1,55E+05	x - 1,58E+03	0,9999	0,26

**Tab. 49: PSP-Toxinkonzentrationen in Kugelfischen aus Japan (HILIC-FLD-Bestimmung)**

Probe	Konzentration (ng g <sup>-1</sup> )					
	GTX1	GTX2	dcGTX2	Neo	STX	dcSTX
2106.10-1	0,0	94,0	22,6	0,0	36,6	22,6
2106.10-2	0,0	83,0	21,3	0,0	32,2	22,4
3822.00-1a	0,0	0,0	0,0	269,8	81,0	136,7
3822.00-1b	0,0	0,0	0,0	0,0	15,5	23,1
3822.00-1c	0,0	0,0	0,0	0,0	22,7	27,2
3822.00-2a	146,0	94,0	8,9	463,3	148,7	265,6
3822.00-2b	0,0	0,0	0,0	0,0	25,4	36,2
3822.00-2c	0,0	0,0	0,0	77,6	33,5	37,4

**Tab. 50: Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die HILIC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen aus Japan**

Toxin	Regressionsgerade	R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)
GTX1	y= 6,009E-06 x + 0,187	0,996	1,00
GTX2	y= 1,621E-07 x + 0,045	0,998	0,03
GTX3	y= 1,417E-07 x + 0,016	0,997	0,03
GTX4	y= 4,133E-06 x + 0,033	0,993	0,78
dcGTX2	y= 3,179E-07 x + 0,054	0,995	0,06
dcGTX3	y= 2,127E-07 x + 0,018	0,997	0,03
Neo	y= 5,899E-06 x + 1,225	0,998	0,93
STX	y= 1,612E-07 x + 0,168	0,996	0,03
dcSTX	y= 1,900E-07 x + 0,279	0,995	0,05
C1	y= 7,186E-07 x - 0,100	0,997	0,10
C2	y= 2,676E-07 x - 0,017	0,998	0,03

**Tab. 51: Regressionsgeraden und LODs (S/N 3:1) für die LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen in Kugelfischen aus Japan**

Toxin	Regressionsgerade	R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)
GTX1	y= 3,30E+04 x + 9,39E+04	0,9966	2,38
GTX2	y= 3,52E+04 x + 1,30E+04	0,9981	1,95
GTX3	y= 3,50E+04 x - 6,08E+04	0,9972	3,85
GTX4	y= 9,89E+03 x + 1,50E+04	0,9871	1,76
dcGTX2	y= 2,42E+04 x + 1,83E+04	0,9977	3,58
dcGTX3	y= 2,54E+04 x - 1,14E+04	0,9953	2,03
Neo	y= 4,12E+04 x + 7,58E+04	0,9904	0,54
STX	y= 1,80E+05 x + 6,39E+04	0,9970	0,45
dcSTX	y= 1,05E+05 x + 3,73E+04	0,9924	0,85

**Tab. 52: Regressionsgeraden, LODs (S/N 3:1) und LOQs (S/N 5:1) für die LC-MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

Toxin	Regressionsgerade				R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)	LOQ (ng on column)
GTX1	y=	3,30E+04	x +	9,39E+04	0,997	2,2	3,7
GTX2	y=	3,52E+04	x -	1,30E+04	0,998	1,9	3,2
GTX3	y=	1,84E+04	x +	4,80E+03	0,998	2,5	4,2
GTX4	y=	1,03E+04	x +	1,31E+04	0,991	1,8	3,0
dcGTX2	y=	2,42E+04	x +	1,83E+04	0,998	3,5	5,8
dcGTX3	y=	2,54E+04	x -	1,14E+04	0,995	1,8	3,0
C1	y=	2,13E+04	x +	1,09E+04	0,998	3,5	5,8
C2	y=	2,67E+04	x +	1,54E+04	0,997	2,7	4,5
B1	y=	1,96E+04	x +	1,21E+04	0,998	1,8	3,0
Neo	y=	8,33E+03	x +	6,20E+04	0,999	1,0	1,7
STX	y=	1,41E+05	x +	1,29E+05	0,999	0,5	0,8
dcSTX	y=	9,38E+04	x +	1,76E+05	0,999	1,1	1,8
TTX	y=	5,77E+04	x +	2,70E+04	0,999	0,8	1,3
AnhydroTTX	y=	6,15E+04	x -	1,16E+03	0,998	0,8	1,1
11-DeoxyTTX	y=	5,40E+04	x +	2,27E+04	0,987	0,9	1,5

**Tab. 53: Regressionsgeraden, LODs (S/N 3:1) und LOQs (S/N 5:1) für die LC-MS/MS-Bestimmung von PSP-Toxinen und TTXs**

Toxin	Regressionsgerade				R <sup>2</sup>	LOD (ng on column)	LOQ (ng on column)
GTX1	y=	4,5E+02	x -	7,0E+03	0,992	0,37	0,62
GTX2	y=	1,4E+03	x +	4,4E+03	0,999	1,20	2,00
GTX3	y=	6,0E+03	x -	2,2E+04	0,999	0,20	0,33
GTX4	y=	4,9E+03	x -	2,0E+04	0,998	0,22	0,37
dcGTX2	y=	1,5E+03	x -	9,6E+03	0,999	0,40	0,67
dcGTX3	y=	8,9E+03	x -	6,4E+02	0,999	0,05	0,08
C1	y=	6,0E+02	x +	6,0E+02	0,999	1,20	2,00
C2	y=	4,0E+03	x +	3,8E+03	0,999	0,21	0,35
B1	y=	3,9E+03	x +	5,4E+03	0,999	0,15	0,25
Neo	y=	2,1E+03	x +	4,0E+04	0,992	1,20	2,00
STX	y=	1,9E+03	x -	6,2E+04	0,997	1,30	2,17
dcSTX	y=	4,8E+03	x +	4,5E+04	0,999	1,10	1,83
TTX	y=	2,2E+03	x +	3,5E+04	0,999	0,34	0,57
AnhydroTTX	y=	2,4E+03	x +	1,5E+03	0,988	0,31	0,52
11-DeoxyTTX	y=	2,7E+03	x +	5,1E+02	0,993	0,35	0,58



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Bernd Luckas für die Bereitstellung dieses interessanten und vielseitigen Themas. Ich danke Ihm für seine wissenschaftliche Betreuung während der Dissertation sowie für konstruktive Diskussionen. Seine Unterstützung sowie die vielfältigen Anregungen waren von großer Bedeutsamkeit bei der Entstehung dieser Arbeit. Er ermöglichte mir durch die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen, die Ergebnisse meiner Arbeit vorzustellen und Erfahrungen im wissenschaftlichen Austausch sammeln zu können.

Weiterhin danken möchte ich Dr. Gunnar Gerdts von der Biologischen Anstalt Helgoland des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung für seine Unterstützung bei der Fertigstellung eines Manuskriptes sowie für seine vielfältigen konstruktiven Anregungen. In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls Anja Benkwitz für ihre Arbeiten im Rahmen des *in vivo* Fütterungsversuches.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Bernd Krock für die Ermöglichung der Messungen mit einem Q-Trap-Massenspektrometer und die Betreuung meiner Arbeiten während des Aufenthaltes am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in der Arbeitsgruppe Ökologische Chemie unter Leitung von Prof. Dr. Allan Cembella, insbesondere auch für seinen Rat und seine Unterstützung zur Analytik mittels Massenspektrometrie und zu den Fragmentierungsuntersuchungen bzgl. der unbekannten PSP-Toxine sowie für zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

Er ermöglichte mir ebenfalls die Messungen an einem hochauflösenden Massenspektrometer am Max Planck Institut für Chemische Ökologie in Jena. In diesem Zusammenhang möchte ich außerdem Dr. Alexandr Muck der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie vom Max Planck Institut für Chemische Ökologie für die Analysen und die Berechnungen der Elementarzusammensetzungen der unbekannten PSP-Toxine danken.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Lebensmittelchemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena möchte ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und

Hilfsbereitschaft danken, insbesondere Frau Katrin Erler für eine intensive Zusammenarbeit auf dem Gebiet der PSP-Toxine und der Analytik mittels Massenspektrometrie.

Dank schulde ich den Wissenschaftlern, die mir Probenmaterial für die Kugelfischanalysen zur Verfügung gestellt haben, ohne welches die Überprüfung der Anwendbarkeit der neu entwickelten LC-MS/MS-Methode nicht möglich gewesen wäre: Dr. Gires Usup (Faculty of Science and Technology, University Kebangsaan Malaysia, Bangi Selangor, Malaysia), Dr. Tadashi Nakatani (Osaka-City-Institute of Public Health and Environmental Science, Osaka, Japan) und Dr. Nguyen Anh Dung sowie Mr. Ding Dang Huy (National Fisheries Quality Assurance and Veterinary Directorate (NAFIQAD), Vietnam).

Ebenfalls für die Bereitstellung von Probenmaterial verschiedener Strains von *Cylindrospermopsis raciborskii* möchte ich Stella Bortoli aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ernani Pinto (University of Sao Paulo, Brasilien) danken.

Danken möchte ich auch meiner Familie und meinem Freund Marko für die moralische Unterstützung und Zuversicht, welche dadurch ebenfalls einen großen Beitrag zur Fertigstellung der Arbeit geleistet haben.

## ERKLÄRUNGEN

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die geltende Promotionsordnung der der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist;
- dass ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;
- dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde;
- dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner vorgelegten Dissertation stehen;
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe;
- dass ich weder die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Tina Helbig

Jena, 07. März 2010